

0004864295

WPI Acc no: 1989-243101/198934

New complexes of drugs - non-covalently bound to antimer or oligopeptide

Patent Assignee: NEORX CORP (NEOR-N)

Inventor: ABRAMS P G; ANDERSON D C; FRITZBERG A R; MORGAN A C; PRIEST H J; RENO J M; SIVAM G P; SRINIVASAN A

Patent Family (2 patents, 6 & countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
EP 329184	A	19890823	EP 1989102809	A	19890217	198934	B
JP 2152993	A	19900612				199029	E

Priority Applications (no., kind, date): US 1988157895 A 19880219

Patent Details

Patent Number	Kind	Lan	Pgs	Draw	Filing Notes
EP 329184	A	EN	35	3	
Regional Designated States,Original	DE FR GB IT SE				

Alerting Abstract EP A

(A) The following complexes are claimed, each involving an 'antimer' non-covalently bound to a drug, where an 'antimer' is defined as a mol. having functional gps. that are opposite and complementary in structure to the drug mol.: (a) complexes in which an antimer is non-covalently bonded to a drug and covalently bonded to a targetting protein; (b) complexes in which a drug is bonded to a targetting protein directly or by a linking gp., and an antimer is non-covalently bonded to the drug; (c) complexes in which a carrier is bonded to a carbohydrate or amino acid residue on a targetting protein, a drug is bonded to the carrier, and an antimer is non-covalently bonded to the drug (d) complexes in which a drug is bonded to an antimer by several non-covalent interactions. (B) Antimers that bind non-covalently with (a) 5-fluorouracil, (b) doxorubicin, (c) methotrexate, (d) cytosine arabinoside, (e) mitomycin C. The antimers are e.g., (a) thiamine derivs., (b) modified, oxidised or non-oxidised flavin adenine dinucleotide or propranol, etc.

USE/ADVANTAGE - Antimers allow drugs to be bound to targetting proteins under mild conditions, without loss of drug activity, giving complexes labile enough to release the drug at the target site. In cases (b) and (c) in (A), the antimer protects functional gps. on the drug and reduces non-specific interactions between. the drug and non-target cells. In case (d) in (A), the antimer controls the bioavailability and toxicity of the drug.

⑫ 公開特許公報(A)

平2-152993

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)6月12日

C 07 K 15/12
3/08
15/28

8318-4H

8318-4H※

審査請求 未請求 請求項の数 37 (全30頁)

⑮ 発明の名称 アンチマーおよびアンチマー複合体

⑯ 特 願 平1-40128

⑰ 出 願 平1(1989)2月20日

優先権主張 ⑱1988年2月19日 ⑲米国(US) ⑳157895

㉑ 発 明 者	アルトン シー. モーガン, ジュニア	アメリカ合衆国, ワシントン 98020, エドモンズ, ドリフトウッド プレイス 803
㉒ 発 明 者	ゴーサラ ビー. シバム	アメリカ合衆国, ワシントン 98020, エドモンズ, ナインティセブンス プレイス ウェスト, 23504
㉓ 発 明 者	ボール ジー. アブラムス	アメリカ合衆国, ワシントン 98121, シアトル, ファースト アベニュー 1602, 2125
㉔ 出 願 人	ネオルツクス コーポレイション	アメリカ合衆国, ワシントン 98119, シアトル, ウェスト ハリソン ストリート 410
㉕ 代 理 人	弁理士 青 木 朗	外4名

最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

アンチマーおよびアンチマー複合体

2. 特許請求の範囲

1. 標的タンパク質、薬剤成分、および該薬剤成分に非共有結合により結合しそして該標的タンパク質に共有結合しているアンチマー成分を含んで成る、標的タンパク質/アンチマー/薬剤-複合体。

2. 前記標的タンパク質がモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体断片である、請求項1記載の複合体。

3. 前記薬剤成分が抗新生物活性または腫瘍細胞への細胞毒を有する、請求項1記載の複合体。

4. 前記アンチマー成分が、イオン結合、水素結合、 $\pi-\pi$ 結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力、およびそれらの組み合わせから成る群より選ばれた相互作用を介して、薬剤成分に結合している、請求項1記載の複合体。

5. 前記薬剤成分が平面環構造を含んで成り、

前記アンチマー成分が該薬剤成分の平面環構造に非共有結合する平面環構造を含んで成る、請求項1記載の複合体。

6. 該薬剤成分が、ドキソルビシン及び他のアントラサイクリン誘導体、アクチノマイシンD、エリブチシン、並びにマイトマイシンCから成る群より選ばれる、請求項1記載の複合体。

7. 前記アンチマー成分が、前記薬剤成分上の1又は複数の官能基に対して化学的に反対の官能基を有する、請求項1記載の複合体。

8. 前記アンチマー成分が、前記薬剤成分の平面環構造上の各電子過剰官能基に立体的に対応した電子欠乏官能基を有し、そして/または、前記アンチマー成分が、前記薬剤成分の平面環構造上の各電子欠乏官能基に立体的に対応した電子過剰官能基を有する、請求項7記載の複合体。

9. 前記アンチマー成分が、前記薬剤成分上の陽性双極子に立体的に対応した水素結合の陰性双極子を有する、および/または、前記薬剤域上の陽性双極子に立体的に対応した水素結合の陰性双

極子を有する、請求項7記載の複合体。

10. 前記アンチマー成分が、少なくとも1つの疎水性相互作用および／または $\pi-\pi$ 相互作用によって前記薬剤成分に非共有結合する、請求項7記載の複合体。

11. 前記薬剤成分がドキソルビシンであって、前記アンチマー成分がフラビンアデニンジヌクレオチドまたはその誘導体である、請求項1記載の複合体。

12. 前記アデニンがリアクチブ・ブルー4である、請求項1記載の複合体。

13. 標的タンパク質、該標的タンパク質に直接もしくはリンカーを介して結合した薬剤成分、および該薬剤成分に非共有結合により結合したアンチマー成分であって、それによって該薬剤成分上の官能基が保護され、該薬剤成分と非標的細胞間の非特異的相互作用を低下させるアンチマー成分を含んで成る、標的タンパク質／薬剤／アンチマー複合体。

14. 前記アンチマー成分および薬剤成分が、平

面融合環構造を有し、さらに前記複合体が、アンチマー成分と薬剤成分間で複数の非共有結合性相互作用を含んで成り、該平面融合環のアンチマー成分が、該平面融合環上の1つ以上の官能基に対して反対の官能基を有する、請求項13記載の複合体。

15. 標的タンパク質、該標的タンパク質上の糖またはアミノ酸残基に結合した担体、該担体に結合した薬剤成分、および、該薬剤成分に非共有結合により結合したアンチマー成分であって、それによって該薬剤成分上の官能基が保護され、該薬剤成分と非標的細胞間の非特異的相互作用を低下させるアンチマー成分を含んで成る、標的タンパク質／担体／薬剤／アンチマー複合体。

16. アンチマーを複数の非共有結合によって薬剤に結合させる方法であって、該薬剤と該アンチマーを脱水剤とともに混合することを特徴とする結合法。

17. 前記脱水剤が、グリセロール、プロピレングリコール、エチレングリコール、硫酸ナトリウ

ムおよび硫酸アンモニウムから成る群から選ばれる、請求項16記載の結合法。

18. 複数の非共有結合性の相互作用によってアンチマーに非共有結合により結合した薬剤分子を含んで成る、活性な薬剤成分の生物学的利用性および毒素を調節するためのアンチマー／薬剤複合体。

19. 前記薬剤分子の血清中半減期が少なくとも20%増加する、請求項18記載の複合体。

20. チミン誘導体から本質上成る5-フルオロウラシルに非共有結合により結合するアンチマー。

21. 前記チミン誘導体が、スキーム1に示される化合物5, 6および7から成る群より選ばれる、請求項20記載のアンチマー。

22. フラビンアデニンジヌクレオチドの修飾型から本質上成るドキソルビシンに非共有結合により結合する請求項22記載のアンチマー。

23. 前記の修飾型フラビンアデニンジヌクレオチドが、フラビン N^6 -(メチル- α -カルボキシアプロビル)アミノメチレンアデノシルジヌクレオチドの遊離酸または活性エステルである、請求項

22記載のアンチマー。

24. $\alpha-1$ -ピペリジニル- $\alpha-N-p-(2, 4, 8$ -トリオキソピリド[3, 2-d]ピリミジン-6-イル)アセトフェニルアミドグルタル酸の遊離酸またはスクシンイミデートエステルから本質上成るメソトレキセートに非共有結合するアンチマー。

25. 6''-カルボキシー-2'-テトラヒドロピロン-2''-イル-5-ニトロイソシチジンから本質上成るシトシンアラビノシドに非共有結合により結合するアンチマー。

26. 4-アミノ-6-ヒドロキシメチル-2, 5-ジオキソピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-(α -メチルチオ)酢酸エチルエステル- N^6 -酢酸 p -(メチルチオ)フェニルエステルのスルホンまたはスルホキシド誘導体から本質上成るマイトマイシンCに非共有結合により結合するアンチマー。

27. 酸化型フラビンアデニンジヌクレオチド、非酸化型フラビンアデニンジヌクレオチドおよび

プロバノールから成る群より選ばれる、薬剤のドキシソルピシンのためのアンチマー。

28. 少なくとも2つの芳香族側鎖を含むオリゴペプチドに非共有結合により結合した芳香族薬剤を含んで成る複合体。

29. 少なくとも2つの芳香族側鎖を含むオリゴペプチドに非共有結合により結合した芳香族薬剤、および該オリゴペプチドに結合した標的タンパク質を含んで成る複合体。

30. 前記オリゴペプチドが、芳香族側鎖を有する少なくとも2つの天然に存在するアミノ酸を含んで成る、請求項29記載の複合体。

31. 天然に存在するアミノ酸の一員ではない芳香族化合物が、前記の芳香族側鎖としてオリゴペプチドの結合した、請求項29記載の複合体。

32. 前記薬剤が2つの前記芳香族側鎖間への挿入によって結合した、請求項29記載の複合体。

33. 前記オリゴペプチドが、アスパラギン酸およびグルタミン酸のうちの少なくとも1つのアミノ酸をさらに含む、請求項29記載の複合体。

34. 1つの非芳香族アミノ酸が、前記オリゴペプチド中の芳香族側鎖を有する2つのアミノ酸の間に介在する、請求項29記載の複合体。

35. 前記薬剤がドキシソルピシンである、請求項29記載の複合体。

36. 前記芳香族薬剤が抗癌剤であって、前記標的タンパク質が癌細胞に結合するモノクローナル抗体である、請求項29記載の複合体。

37. 前記芳香族薬剤および各芳香族側鎖が複数の芳香環を含んで成る、請求項29記載の複合体。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、薬剤分子を担体または抗体に非共有結合により結合させるために機能する、「アンチマー」(antimer)と呼ばれる化合物に関し、この際、親和性は、薬剤を担体または抗体からほとんど解離させない程度であって、薬効の損失は全くないが、毒性は減少する。このような化合物は、抗体やその他の標的タンパク質などような輸送系物質に薬剤を結合させるために用いることができ

る。アンチマーは、天然に存在するものであるか、又は薬剤に特異的結合をもたらすように設計することができる(「設計アンチマー」)。この結合は、構造は類似しているが、1つ以上の「対立」官能基を有し、各薬剤の官能基に対して非共有結合により結合することができ、それによって、複数の非共有結合的相互作用を介して、薬剤との複合体を形成することができる化合物を用いて行われる。

〔発明の背景〕

癌の治療に対して、いわゆる「ミサイル療法」への関心が高まってきた。最近では、モノクローナル抗体などの特異的抗体に新生物の化学療法薬を結合させ、正常組織には作用せず腫瘍細胞を選択的に標的とし得る複合体の調製が試みられている。様々な種類の薬剤が、この応用に向けられている。これらには、 β -及び α -放射性同位元素、植物及び細菌の毒素、および挿入剤、代謝拮抗物質、アルキル化剤ならびに抗体などの様々な抗新

生物剤が含まれている。化学療法薬と抗体との結合が望ましいが、それは以下の理由による。

1. 近年、薬剤は、抗原特異的モノクローナル抗体に結合させた場合、遊離で添加したときより、約1000倍程度多く腫瘍細胞に到達する、ということが示された。

2. 多面発現作用を有する薬剤の耐性は、様々な化学療法薬の1つによる処置後に起きる可能性があり、数種の薬剤への耐性を引き起こす結果を招く。このような耐性の機構は、完全に解明されているとは言えないが、耐性が薬剤の標的抗体によって部分的に解消する場合もあることが知られている。

3. 今日の化学療法剤は主要な腫瘍型の幾つかのみに有効であるが、薬剤に非感受性の腫瘍型の反応速度が抗体介在型の供給によって増加することがある。

4. 現在、化学療法薬にみられる様々な用量制限の毒性が、抗体への結合によって減少することもある。少なくとも等しい有効性を伴って毒性低下

が認められれば、この薬剤は優れた製剤であって、高い化学療法指数を有するものとえよう。

薬剤と抗体との複合体を調製するために、薬剤を、抗体のある種の基（例えば、リジン残基、カルボキシル基、又はスルフヒドリル基）の求核置換によって抗体に直接結合させることができる。また、薬剤は、ヘテロもしくはホモ二機能性の架橋性リンカーを介して抗体に結合することも可能である。リンカーは、低分子量有機化合物でもよくまたは結合用の架橋剤で置換したペプチドであってもよい。リンカーを含む高分子量担体を用いられることもあり、それによって、単一抗体に多数の薬剤分子が結合可能となる利点が生じる。担体の例では、リジンとグルタミン酸とのポリマー、デキストラン、ならびにポリペプチドアルブミンが挙げられる。

従来、薬剤は、共有結合子を利用することによってのみ抗体に結合されていた。BlairおよびGhose, J. Immunol. Meth. 59:129-144, 1983 参照。共有結合は、さらに、代謝不可能な結合と代謝可

能な結合とに分類できる。代謝可能な結合は、加水分解を起こすことができ、低pH、還元的環境、タンパク質分解などの細胞内または細胞周囲の条件で、薬剤の放出を引き起こす。有用な代謝可能な結合の例として、細胞内のエンドソームの低pH環境に感受性のあるものが挙げられる。ShenおよびRyser, Biochem. and Biophys. Res. Commun. 102: 1048-1054 参照。薬剤-抗体複合体は、細胞への結合の後、エンドソームに導く経路によって内在化(internalize)され、そこで複合体は低pH環境にさらされる。複合体の共有結合の加水分解によって、薬剤が遊離し、その細胞障害活性を発揮する。

代謝不可能な結合によっても、活性な薬剤複合体が調製可能である。しかし、代謝不可能な結合で生じる複合体は、代謝可能な結合によって形成される複合体と比較して、薬効の低下が見られる。これは、細胞内のタンパク質分解過程によって、代謝可能な結合子ほど有効に薬剤の放出が生じないからである。さらに、薬剤は、その放出が生じ

た場合、一般には元の薬剤と異なった形をとり、細胞毒性の低下が見られる。

薬剤が抗体に直接結合するか、または薬剤が抗体への結合に先立って担体に結合される共有結合性薬剤/抗体複合体が調製されている。米国特許第 4,507,234号、およびGarnetとBaldwin, Cancer Res. 46:2407-2412参照。直接的結合は、抗体分子内での残基、例えば、リジンならびにグルタミン酸のアミノ基、スルフヒドリル基と、オリゴ糖鎖の糖残基との結合によるものである。この直接的結合法に係る重大な限界は、抗体投与後の血清中からの抗体のより急速な消失が生じるような厳しい結合条件にさらされる可能性がある、ということにある。直接結合法が、部位特異的（例えば、糖鎖またはスルフヒドリル基に）でなければ、複合体の免疫反応が低下することがある。部位特異的な結合が生じて、抗体へ結合した薬剤の性質によって、直接結合は、非選択的（例えば、ほぼ等しい効力で抗原陽性および抗原陰性細胞を殺す）で、弱い標的局在化を生じさせる場合がある。例

えば、部位特異的なスルフヒドリル基を介して抗体に結合したリシンA鎖は、リシンA鎖上の糖鎖のマンノースレセプタに起因する、肝の貧食作用によって急速に取り込まれる。これは、極めて親油性の強い薬剤を用いても生じる可能性がある。遊離薬剤形中での親油性薬剤は、細胞と相互作用のために有効な何らかの手段を有するにちがいないからである。親油性薬剤に関するこのような1つの機構として、細胞膜脂質二重層への挿入が挙げられる。この直接的薬剤/抗体複合体が代謝可能な共有結合によって形成されるならば、この結合は、血中、肝、脾、その他の器官など、体内の他の部位で代謝されることが多い。

間接結合法は最初に、通常ではリンカーを介して、薬剤の担体への結合を必要とする。この担体は続いて、最初に担体に結合し次に薬剤の結合後に活性化されるヘテロ二機能性リンカーを介して、抗体に結合する。この間接結合法の1つの利点は、抗体に結合した多数の薬剤分子が、標的部位への供給のための抗体に結合する可能性がある点にあ

る。しかし、多数の薬剤分子が、例えば、薬剤の親脂性により、非特異的取込みの亢進をもたらすこともある。この間接結合法では、抗体が厳しい結合条件にさらされることはない。化学的操作は一般に抗体に対してではなく担体に対して行われるからである。さらに、担体は、薬剤複合体の溶解性を高めることもある。

抗体に対する薬剤の直接または間接結合法を用いれば、安定な複合体が標的部に到達し、薬剤の解離が最小限に抑えられる。しかし、最大の効力を得るためには、この性質を薬剤の選択的放出機構と組み合わせる必要がある。

選択的放出は、3つの段階で説明することができる。第1は、腫瘍細胞中での細胞内放出である。この型の放出の最適例は、複合体の細胞内処理に際し、分解して遊離薬剤の放出をもたらす、pH感受性および運元的結合である。これには、薬剤の解離に先立ち、複合体の結合および内在化が必要である。細胞内での複合体の内在化には、複合体が細胞質に入るか、エンドソームもしくはライソ

ゾームに取り込まれることが必要である。固形腫瘍の抗原に対するモノクローナル抗体の内在化速度は小さい。従って、そのような薬剤の放出過程を必要とする薬剤複合体は、それほど強力とは言えないようだ。さらに、すべての内在化された複合体が、活性薬剤の放出のための適当な細胞内過程を経るわけではない。ライソゾーム中で処理される複合体は恐らく分解され、不活性されるものもあろう。エンドソームまたは細胞質中で処理される複合体には、それらの薬剤を放出する機会があり、薬剤が細胞内標的へ到達する。

複合体からの薬剤の選択的放出に関する第2の部位は原形質膜である。原形質膜放出機構の1例は、米国特許第4,671,958号に言及されている。この例では一度腫瘍細胞に結合した複合体は補体を活性化し、この補体が、薬剤が結合している感受性の高いペプチド結合の酵素的分解を引き起こし、それを遊離形で放出せしめる。

薬剤放出の第3レベルは、腫瘍部位にあって、複合体が腫瘍細胞に結合する前の段階である。こ

の放出段階には、腫瘍組織と正常組織との間の細胞内環境の差異を利用するような、薬剤/抗体結合が必要である。そのようなものは、今まで開発されていない。

リンカーを介した担体の使用の有無に拘らず、部位特異的または非特異的に抗体に共有結合した細胞障害剤または抗新生物剤から成る、上記の共有結合性薬剤複合体には多くの問題がある。第一に、抗体への薬剤の共有結合では、抗体または担体の基に結合可能な薬剤形を生じさせるために、薬剤の誘導体形成が必要である。一般にこれは、官能基の化学修飾による薬剤の細胞障害活性または効力の低下をもたらす。幾つかの薬剤については、誘導体形成を行うだけで薬剤が完全に不活性化される場合もある。また、誘導体形成が十分に調節されず、その結果、薬剤の細胞障害活性に重要な基が、それがこの方法での1次標的とはならないにもかかわらず、化学的に修飾されることがある。pH感受性結合などの不安定な結合の使用は、この問題の解決についながらる面もあるが、標的部

位で薬剤の放出が比較的遅くなったり、薬剤が活性の低い修飾型で放出されることもある。

複合体からの薬剤の細胞外放出は、米国特許第4,671,958号に記載されているように、複合体に関連した、内在化および細胞内処理の問題の解決をもたらす。しかし、この薬剤は、抗体分子中の糖鎖に共有結合により結合するためには、直接にまたは担体仲介系を介して導体化される必要がある。さらに、薬剤の放出速度は、腫瘍細胞の原形質膜上の抗体の半減期、及び抗体の補体固定速度により左右されよう。この過程の欠点は、ほとんどのマウスモノクローナル抗体（使用頻度が高い）についてそれらのヒト補体固定能が極めて低いことである。

薬剤と抗体の免疫複合体の現世代は、選択性の低さという別の問題も抱えている。低い選択性の問題は、抗原陽性および抗原陰性細胞に対して、*in vitro*で薬剤複合体を試験することによって評価することが可能である。抗原陽性細胞は、一般に、抗原陰性細胞より10分の1以下の薬剤複合

体濃度で死滅する。例えば、アントラセン複合体について、これが言える。逆に、同一の抗体と植物または細菌毒素との複合体は、3ないし4桁強い選択性を示す。従って、細胞障害性薬剤自体が細胞膜と相互作用するための別の機構を有し、それによって非選択的細胞毒性の生じることが予想される。さらに、しばしば、1個の抗体分子に結合する1個より多くの薬剤分子が存在し、各薬剤分子が非選択的細胞相互作用を行うことができる。従って、薬剤免疫複合体の選択性を改善する技術の必要性は極めて高い。これによって、腫瘍部位への *in vivo* 改良された供給、および正常組織での取込みの低下がもたらされるであろう。

〔発明の要約〕

上記の問題を解決すべく、この発明は、抗体又はその他の担体分子へ薬剤を結合させる非共有結合法の使用によって改良された免疫複合体の産生に関する。非共有結合法の使用は薬剤を厳しい誘導体形成条件に暴露せず、薬効を低下させない。

以下「設計アンチマー」と呼ぶ。）

薬剤と担体タンパク質または抗体との非共有結合的会合は、結合親和性はランダムであり、そして不均一であり、一般には結合薬剤の低レベルをもたらす。安定性の低い結合薬剤は、早過ぎる放出の可能性の増大及び宿主への毒性の危険性増大、および腫瘍部位へ局在化する能力の低下によって、不適切と見られる。この発明はアンチマーを提供し、このアンチマーは薬剤分子に適合しそして薬剤との多数の非共有結合性相互作用を受け、抗体又は担体へのその結合親和性を高め、そして薬剤のほとんどがなお結合した状態で標的部に達するほど十分安定な複合体提供するように特に設計されている。

この発明はまた、薬剤とアンチマーの可溶性複合体に関する。この前形成複合体は、細胞障害療法の毒性を低下させ、又は遊離薬剤の徐放性のための機構を付与するための製剤として投与される。アンチマーは単独で、静注部位周辺におけるドキソルビシンの溢血といった毒性を予防するために、

非共有結合法の使用は、標的細胞に対して十分に高い薬剤の結合親和性を生じさせるが、しかし標的部位で細胞障害剤が腫瘍細胞内または細胞表面上の薬剤レセプタに移行し得る程度に不安定である。実際、非共有結合法の長所の1つは、それによって、相互作用の親和性の別々の検定が可能となり、薬剤の結合と放出との望ましい均衡が得られる点である。この発明の複合体は、それぞれ、緩徐な薬剤放出または標的化された薬剤の供給のための担体-薬剤または標的タンパク質の複合体を含んで成り、抗体もしくは抗体断片などの標的タンパク質または担体分子、「アンチマー」と呼ばれ、抗体又は担体に共有結合した成分、および該アンチマーに非共有結合した薬剤を含んで成る。異なった配置において、薬剤をまず抗体もしくは担体に共有結合せしめ、続いてアンチマーに結合せしめて、細胞殺傷能の選択性を改善することができる。このアンチマーは、天然に存在するものであってもよく、又は特に設計されたものでよい。（このように特に設計されたアンチマーを、

薬剤の局所投与部位に注射することもできる。

この発明の説明に先立って、以下のような定義が有用となろう。

・アンチマー：「アンチマー」という表現は、現在、この分野では用いられていないが、ここではこの発明を説明するために使用した。接尾語「mer」は、化学種のもう一方の化学種との関連を表すために当業界において用いられる。例えば、「isomer（異性体）」とは、ある化合物に対して、原子の数と種類は同一であって、立体配置が異なるもう一方の化合物を指す。「antimer（アンチマー）」とは、もう一方の分子形に対して対立しそして相補的な形を有する分子をいう。この明細書では、アンチマーという用語は、ある薬剤分子に構造的に逆でありそして相補的である官能基を備えた分子を指すために用いる。このアンチマーおよび薬剤は、類似の平面環構造を有し、対立する官能基を有することが好ましい。アンチマーの対立する官能基には、水素結合及びイオン結合に関する基、並びに π π 結合を増加させるアンチマー

上の電子欠乏基（例えば、酸性プロトンを与える基）または電子過剰基（例えば、ヘテロ原子およびカルボキシレートなどのアニオン基上における非共有電子対）の有無に拘らないその他の非共有結合的相互作用が含まれる。さらに、アンチマー上の対立官能基が立体的に適切な3次元配置を取るため、薬剤上の官能基は、適正な立体配置でアンチマー上の対立官能基との相互作用が可能となる。

・官能基：官能基とは、もう一方の基と、相互作用が可能であって、会合または結合し得る分子の一部である。例えば、電子過剰基、電子欠乏基、水素結合能のある双極子、およびイオン性原子団が、官能基の例として挙げられる。第1図のドキソルビシンの構造を参照すると、ケト基、水酸基、メトキシ基、およびアミノ基が、ドキソルビシン上の官能基の例といえる。

・抗新生物剤：抗新生物剤とは、DNA、RNA、タンパク質合成、その他の重要な細胞の機能を抑制する能力のために細胞障害活性を有し、最終的には

細胞死をもたらす薬剤を指す。

・非共有結合：非共有結合は、イオン結合、水素結合、 $\pi-\pi$ 結合、疎水性相互作用、およびファンデルワールス相互作用として定義される。

・共有結合：共有結合は、有機2分子間におけるシグマ結合の形成として定義される。

・電子過剰基：電子過剰基は、過剰な電子、または利用可能な塩基性で非結合性の電子対を含む。電子過剰基には、カルボキシレート、スルフィネート、フェノキシドだけでなく、酸素、イオウならびに窒素などの非共有電子対を有するヘテロ原子含有基が含まれる。

・電子欠乏基：電子欠乏基は、カチオン、電気陰性度の高い原子団などのように電子欠乏状態にある。電子欠乏基には、ヘテロ原子に結合したプロトン（酸性状態）に限らず、アンモニウムの窒素原子、およびニトロ基が含まれる。

・立体配置：アンチマー上の官能基の立体配置とは、アンチマーの立体官能基が薬剤の官能基の反対側に向くように並び、薬剤の官能基とアンチマ

ーの対立官能基との非共有結合を可能にする配置を示す。

・担体：担体とは、ポリマーリジン、ポリマーグルタメート、ポリマーデキストラン、またはアルブミンなどのポリペプチド、ポリマー、またはタンパク質を示す。担体は、薬剤を抗体または標的タンパク質に結合させるために用いられ、これにより抗体の免疫原性を低下させずに、有効投与量を増大させる。

・標的タンパク質：標的タンパク質には、標的細胞または標的部位に特異的に結合し得るとのようなタンパク質鎖成分も含まれる。標的タンパク質の例として、抗体、抗体断片（ F_{ab} 、 $F_{(a,b)}_2$ 、および F_{ab} ）、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体断片、および特定の細胞のレセプタに結合し得るペプチドホルモンが挙げられる。

・リンカー：担体または抗体に薬剤を結合させる、ヘテロまたはホモ二機能性結合子を有する小ペプチドまたは有機化合物分子。

・相補基：相互に反応可能であって、2分子間で

引力を生じるような官能基。電子欠乏基および電子過剰基は、相補基の一例である。

要約すると、この発明はアンチマー、アンチマー／薬剤複合体、担体／アンチマー／薬剤複合体、標的タンパク質／アンチマー／薬剤複合体、標的タンパク質／担体／アンチマー／薬剤複合体、標的タンパク質／薬剤／アンチマー複合体、標的タンパク質／担体／薬剤／アンチマー複合体、および、薬剤と多数の非共有結合性相互作用を起こすアンチマー（天然型もしくは合成型）を設計したり調製する方法に関する。各相互作用は、それ自体では比較的弱い、組み合わせた場合、それらは薬剤に対して強い結合をもたらす。薬剤に対するアンチマーの非共有結合は、様々な点で、薬剤－レセプタ部位の相互作用と類似している。その作用は、疎水結合、イオン結合ならびに水素結合の組み合わせであり、レセプタに対する薬剤の安定で且つ選択的な結合を生じさせる。このようなアンチマー分子は、協奏的で複数の非共有結合性相互作用により薬剤の安定な接合体または複合体

を生じさせる。アンチマーに非共有結合した薬剤の安定な複合体は、続いて、アンチマーの部分で標的タンパク質に共有結合する。これは、アンチマー分子、すなわち、複合体形成をすべき薬剤と構造的に類似するがしかし対立する又は相補的な官能基を有する分子の形成から始まる。アンチマーの反対で相補的な官能基は、薬剤の官能基に配向するようにアンチマー分子上に配向される。これによって、一般には、薬剤とアンチマーの構造が同様の空間配置をとる結果になる。

アンチマーと薬剤が、可能な限り、互いに同じ平面環構造をとることが好ましい。これによって、「スタッキング」、および $\pi - \pi$ もしくは電荷移動相互作用が起きる。高親和性結合を生じるにはこれらの作用だけでは不十分であり、そしてそれ故に対立する相補的官能基が平面環構造の周りに位置し、水素結合またはイオン結合を介して薬剤の官能基と相互作用する。さらに同様に、電子過剰基が薬剤上に存在すると、薬剤とアンチマーとの $\pi - \pi$ またはスタッキング作用を高め

るように電子欠乏基をアンチマーの平面環構造上に配置することができる。

非共有結合の一つの形は、環構造間に形成される疎水性 ($\pi - \pi$) 結合である。この環構造は、類似の立体配置をとることが好ましい。平面環構造は、類似の立体配置の実例である。水素結合は、 $-C=O$ などの陰性双極子と OH などの陽性双極子との間で起こり得る。水素結合は、 $C=O$ カルボニル基中の酸素などの塩基性の非共有電子対を含むヘテロ原子のある基と、置換型アミン及びヘテロ原子上の酸性を示すプロトンのごときカチオンを有する基との間で形成される。イオン性の非共有結合は、ホスフェート、ホスホネート、スルホネート、およびプロトンに強く結合したその他の基と、 NH_4^+ などのカチオン基との間で形成される。官能基は、官能基が存在する環構造との関連のために非共有相互作用を行うそれらの能力において異なることができるから、上記の例は限定的ではない。

しばしば、ドキソルビシンなどの薬剤によって、

注射部位において一種の毒性としての溢出血または局所性壊疽が生じる。ドキソルビシンとアンチマーの同時投与の場合、またはアンチマーを後で投与した場合、アンチマーは、局所の注射部位で遊離の薬剤に結合し、遊離の薬剤の局所的溢出血を減少させる。同様に、その他の局所性壊疽形成薬の局所的毒性は、アンチマーの投与によって低下することもある。

アンチマーを特定の薬剤に非共有結合させる設計において、アンチマーの構造に対する薬剤全体の親和性は、薬剤とアンチマー間での可能な非共有結合性相互作用の数を増加または減少させることによって調節できる。一般に、この結合は、薬剤/アンチマーが *in vivo* 供給のために十分に安定となるために、 10^{-6} mol/l 以上でなければならない。しかし、その親和性は、標的アクセプタ部位への薬剤の最終的移行のために十分低くなければならない。非共有結合性相互作用を起こし得るアンチマー上の基の数は、基の数が異なる環の有機合成、またはアンチマーの単純な酸化もしくは

は還元によって変更できる。一例として、ドキソルビシンに対する天然のアンチマーであるフラビンアデニンジヌクレオチドが挙げられる。これは、その還元状態で1分子のフラビン当たり3つの水素結合の、酸化状態でただ1つの水素結合の能力を有する。

複合体形成に関して、指定されたR基(各実施例参照)においてFADが修飾される。その他の薬剤に関する設計アンチマーを実施例9~14に示す。さらに、FADアンチマーは、類の環構造を有するその他の既知製剤をドキソルビシンに結合させるために用いられる。それらの例には、アントラサイクリン誘導体、モルホリノ及びシアノモルホリノドキソルビシン、エビルビシン、アクチノマイシンD、エリブチシン、並びにマイトマイシンCが挙げられている。

薬剤とアンチマー/との最初の非共有結合性相互作用は、必要に応じて、脱水剤の存在下で薬剤/アンチマーの複合体形成を行うことによって高められる。 $\pi - \pi$ および疎水性相互作用を水

分子が妨害するであろう。従って、水を除去すると、初めにこれら結合の相互作用が増強される。複合体は、一度形成されると、その安定性によって再水和されにくくなる。以下の第1表に、薬剤／アンチマ－の相互作用を促進する脱水剤、および薬剤とアンチマ－との至適相互作用を生じる対応する濃度範囲 (v/v) を示す。

第 1 表

脱 水 剤	濃度範囲
グリセロール	0.5 ~ 3.0
ポリエチレングリコール	0.5 ~ 1.0
エチレングリコール	0.5 ~ 5.0
硫酸ナトリウム	0.5 ~ 1.8
硫酸アンモニウム	0.5 ~ 5.0

この発明は、また、「アンチマ－増幅」の概念を描く。アンチマ－増幅は、抗体分子がアンチマ－と複合体形成する場合に達成される。続いて、薬剤が複合体化したアンチマ－と複合体を形成す

る元の薬剤は、まだ第二のアンチマ－分子と反応することができ、そして3分子間で平衡複合体を形成することができる。アンチマ－の第二層を添加してから、薬剤の第二層を加えることができる。この過程は、複合体の溶解性が減少するまで繰り返すことができる。このスタッキング過程は、「アンチマ－増幅」と呼ばれ、抗体の低レベルの誘導体化を伴って複数の薬剤分子が運ばれることを可能にする。

アンチマ－の複合体を作る別の方法は、細胞と薬剤との正常な相互作用を妨害するために、直接または担体を介して抗体に共有結合した薬剤を複合体化するものである。多数の薬剤の中でいかなるものも、抗体に結合することができる（例えば、アントラサイクリン）。このアンチマ－は薬剤の複合体形成後に混合物中に透析される。この状況で、アンチマ－は、薬剤を細胞から遮蔽する役割を果し、複合体の標的への指向を指令する抗原抗体反応のみを許容する。アンチマ－は、薬剤との複合体形成によって選択することができ、そして

次に効力の保持について試験される。この出願の実施例8で示されるように、異なった親和性を有する様々なアンチマ－によって異なった程度で *in vitro* 活性が低下するであろう。

この発明の複合体および接合体は、適切な方法、例えば、静脈内、皮下、リンパ管内、腹腔内、筋肉内、標的組織へ直接、または経口などのいかなる経路によっても *in vivo* で投与することができる。注射によって投与される複合体または接合体は、この発明の複合体または接合体および製剤の分野では既知の担体から成る組成物の形態を取っている。

薬剤／アンチマ－／抗体複合体を調製する「後形成」(post-form) 法は、二段階法である。最初の段階では、アンチマ－を抗体に共有結合する。次の段階で、薬剤をアンチマ－に非共有結合により結合させる。薬剤の結合に関しては、アンチマ－のすべての官能基が使用される必要はない。すなわち、複合体形成のための置換のためにはカルボキシル基のようないくつかの基が利用される。

複合体形成に有用な求核基には、例えば、活性化エステルまたはマレイミドが挙げられる。アンチマ－には、部分的アンチマ－であるが内因性の基またはタンパク質に隣接した場合に完全なアンチマ－構造を取り得る分子により置換された標的タンパク質または担体の組成物も含まれる。

部分的アンチマ－として、カルディオリピンおよびアデノシン三リン酸の2例が挙げられる。それぞれには、ドキソルビシンと強いイオン結合を行い得る隣接リン酸基が少なくとも2つ含まれている。そういった「部分的アンチマ－」が、芳香族アミノ酸に併置して、抗体または担体に結合すれば、これらのアミノ酸にはさらにドイまたは水素結合が生じ、完全なアンチマ－構造が形成される。理論的には、芳香族残基と部分的アンチマ－との併置は、完全なアンチマ－構造の複合体形成ほど調節が容易ではない。

ある種の条件下では、結合可能なアンチマ－構造を形成する芳香族および荷電アミノ酸の適切な併置が抗体またはアルブミンのような担体タンバ

ク質に生じて、反応を開始するのに脱水剤のみを必要とする。しかしながら、タンパク質と高度の相互作用を起こす薬剤は一般的ではない。薬剤のアルブミンとの結合が、それに類似した例といえる。一般に、アルブミンの分子内には、薬剤に対して高親和性を示す部位と低親和性を示す部位がある。高親和性部では、荷電アミノ酸残基と芳香族アミノ酸残基との併置が必要である。これによって、アルブミンは、薬剤との結合に必要な相互作用のいくつかを満たすため、有用面もあることが示された。これは当該分野で周知の事実であるので、この発明の目的は、第1表に示したような、薬剤/タンパク質の相互作用を促進する薬剤の使用にあって、非共有結合薬剤/タンパク質複合体の標的供給への応用もこの発明の一部である。

この発明の一態様では、芳香族薬剤が、オリゴペプチドまたはその類似体上の2つ以上の芳香族原子団に非共有結合（例えば、挿入）する。これら芳香族原子団は、同一の場合もあり異なっている場合もあり、そして一般にペプチドまたはペプ

チド類似体の「骨格」上の側鎖（例えば、酸素、窒素、その他のヘテロ原子で置換可能な総鎖）である。得られた複合体は、通常、薬剤が唯一の平面環構造と相互作用を介して結合した上記のアニチマー複合体よりも安定な薬剤結合を示す。この薬剤担体系は、癌を含めて様々な疾病の治療に用いられる芳香族薬剤のために有用であるにちがいない。

この発明における上記態様の一例は、芳香族側鎖を有する2つ以上のアミノ酸を含んで成るオリゴペプチド配列である。「芳香族側鎖」とは、少なくとも1つの芳香環を含む側鎖を指す。これら芳香族側鎖は、2本の側鎖との相互作用（挿入など）を介して芳香族薬剤の結合を可能にするような配置を取っている。標的タンパク質は、既知のタンパク質工学または組換えDNA技術を用いて、目的のオリゴペプチドが含まれるように設計することができる。また、オリゴペプチドは、好ましくは薬剤の結合後で、標的タンパク質に結合させることができる（例えば、架橋剤を用いて）。得

られた複合体は、*in vivo* で目的の標的部位に薬剤を精送するためには有用である。

上記のオリゴペプチドは、既知のペプチド合成法を用いて合成することができ、これらは天然およびいわゆる非天然アミノ酸の両方を含む。これらオリゴペプチドは、合成ペプチドの芳香族アミノ酸鎖間への薬剤の挿入、または薬剤とペプチド側鎖と他の相互作用によって、薬剤と非共有結合するように設計される。完全な複合体をより水溶性にするためそしておそらく薬剤の結合を補助するために、電荷を有する側鎖をオリゴペプチド中に近接して含めることができる。ペプチド配列中のアミノ酸を、電荷密度および2次構造の調整のために選択して、芳香族薬剤を抗体へ結合させる初期の試みを満たせなかった深刻な溶解性の問題を解決することができる。薬剤を挿入または結合させる配列の反復単位を含めることによって、オリゴペプチドが複数の薬剤分子に結合することが可能となり、それによって標的タンパク質に複数の薬剤分子を付加して治療効率を高めることが

できる。

オリゴペプチド中の側鎖の型および位置は、結合されるべき薬剤の構造に従って選択される。薬剤は、以下の例の一つに存在するものを含む上記芳香族薬剤の一種のような少なくとも一つの芳香族環を含有するものが挙げられる。ペプチド骨格上の側鎖には、結合されるべき薬剤の環に類似した平面環構造が少なくとも一つ存在しなければならない。この薬剤が複数の環を含むものであれば、側鎖は、強固な薬剤の結合のためには複数の類似の環を含むことが好ましい。オリゴペプチドの側鎖との相互作用による結合であれば、薬剤は、その環が側鎖の類似の環にある角度を取るか平行となるような位置に存在し得る。その結果、ペプチド側鎖上の芳香環は、薬剤分子の芳香環と面対面、縁対面、又は面対縁に結合する。その他のペプチド側鎖は、反対の電荷の相互作用を介して薬剤の結合を助けるように近くに配置することがある。負電荷アミノ酸、すなわちグルタミン酸またはアスパラギン酸を使用して、例えば、ドキシソルビシ

ン(NH₃⁺ 基を含む)の結合を助けることができる。

上記のオリゴペプチドは、少なくとも1つの芳香環を含む側鎖を有する天然型アミノ酸、例えば、トリプトファン、フェニルアラニンおよびチロシンを含むであろう。また、ペプチド骨格に他の適切な芳香環含有側鎖、例えば、9-フルオレニルメトキシカルボニル(FMOC)、ピレン、レイン、ユニブルーA、アクリジンTCR191、ヒスチジン-N-ジニトロフェニルもしくはベジル基、または目的薬剤の芳香環部分さえも含むようにオリゴペプチドを合成することができる。側鎖は、結合すべき薬剤の構造に類似性を有するものを選択する。複合体の形成を示唆する薬剤を沈殿させるような芳香族化合物も、側鎖として使用される(例えば、ドキシソルピシンに対するプロプラノロール)。

別の方法として、側鎖を、オリゴペプチド配列の合成後に結合させることもできる。2つ以上の同一アミノ酸を含んで成るオリゴペプチドの合成に直交(orthogonal)保護基を使用すると、異なる条件下で脱保護される基によってそれらを保護する

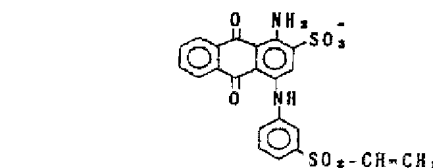
ことにより、同一アミノ酸残基のそれぞれに異なる側鎖を有する結合単位を合成することができる。市販の直交基には、例えば、システインのためのp-メチルベンゼン基及びアセトアミドメチル基、並びにリシンのための2,6-ジクロロベンゾキシカルボニル基、FMOC又はトリフルオロアセチル基が挙げられる。

システイン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン又はアルギニン残基に容易に結合し得る複合体形成性芳香環基は、Richard Harglandの「Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(1985)」(Molecular Probes, Eugene, Oregon)に記載されている。例えば、ヨウ化アルキル基またはマレイミド基を含んで成る芳香族化合物は、オリゴペプチドのシステインと反応し、側鎖としてペプチド骨格にその芳香族化合物が結合する。芳香族イソチオシアネート、塩化スルフォニル、スクシニイミドエステル、ジクロロトリアジニル基もしくはハロゲン化アルキルニトロベンゾキサゾール誘導体などの芳

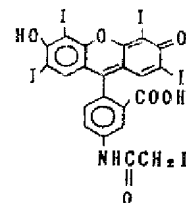
香族化合物は、リジン残基と反応し得る。アミン基を含む芳香族化合物は、カップリング剤のカルボジイミドを用いてアスパラギン酸またはグルタミン酸に結合可能である。カルボキシ基、フェニル基、フェニルグリコシル基、またはジカルボキシアリデヒド基を含む芳香族化合物は、アルギニン残基と結合可能である。

こういった芳香族化合物の中には、以下のように、ある種のアミノ酸残基に側鎖として結合し得るものもある。

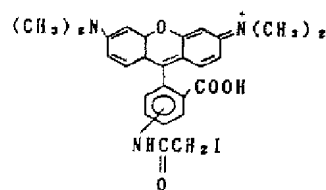
チオール反応性(システイン残基への結合)



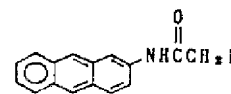
5-ヨードセタミド
フルオレッセイシ



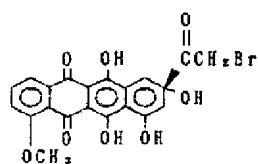
エリスロシン-5-
ヨードセタミド



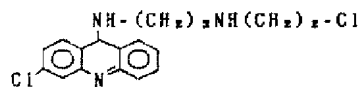
テトラメチルローダミン5
(又は6)-ヨードアセタ
ミド



2-アントラセン
ヨードセタミド

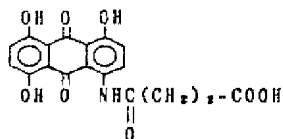


臭素化ダウノマイシン
アグリコン

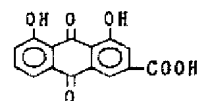


アクリジンICR 191

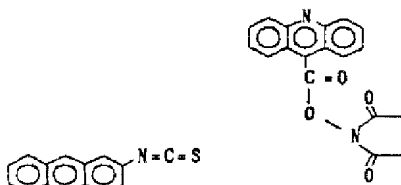
アミン反応性（リシン残基）



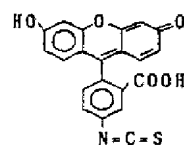
ロイコキニザリン誘導体



ライン

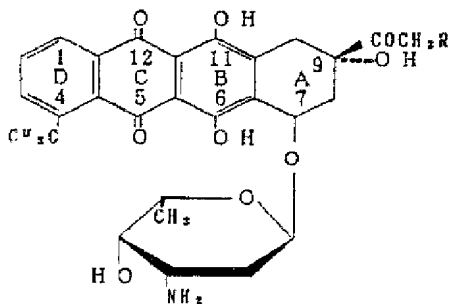


2-アントラセ
イソチオシアネート



フ ル オ シ ッ セ イ ン ー
3 ル イ ソ チ オ シ ア ネ
ー ト

これらの芳香族化合物は、以下の構造式で示される癌の治療に幅広く適用されるアントラセン環の抗生物質、ドキソルビシンおよびダウノルビシンの非共有結合に有用である。



ドキシルピシン : $R = OH$
 ダウノルピシン : $R = H$

側鎖としてペプチドに結合し得る他の芳香族化合物には、プリン、ピリミジン、それらの類似体がある。適当な長さのオリゴペプチドは、同族塩基（例えば、グアニン、シトシン、チミン、およびアデニン）を取り込むこともでき、それらの塩

基によって、DNAが巻き戻って水素結合を形成した後、有効な取りこみのための二重鎖伸長DNAを模倣するであろう。これら薬剤の中で、ドキソルビシンは、DNA中へ入ることが知られている。従って、合成ペプチドは、挿入のためのDNA類似体として作用するといえよう。

個々のオリゴペプチド結合単位は、長いペプチド担体に結合し、抗体1分子あたりに非共有結合する薬剤の化学量論値を増加させる。ペプチド担体は、ドキシソルピシンなどの薬剤が結合するとき、不溶性であれば、ペプチド上でより水溶性の芳香族側鎖を用いるか、1結合単位当たりグルタミン酸またはアスパラギン酸などのより多くの荷電アミノ酸を含有させることによって、溶解度を増加させることができる。ペプチドは、その長さが増すほど二次構造を形成しやすく、 α -ヘリックスまたは β -シート構造のような規則的構造は、結合単位の側鎖からの斥力によって、薬剤の結合を阻害し得る。2分子以上連続したグリシンを結合単位間に挿入し、規則的二次構造を破壊しやすい

グリシンの立体的柔軟性のために、各単位を立体的に調節することができる。さらに、規則的二次構造を破壊するために、結合単位間にプロリンを挿入することもできる。より溶解度の高い伸長されたペプチドのコンホメーションは、薬剤-結合単位間への2つ以上のグルタミン酸の挿入によって達成され、電荷の反発による鎖の伸長を可能にする。

連続するグルタメートを有するペプチドは、抗体複合体が細胞内に取り込まれた後、グルタメートヒドラーゼによってライソゾーム中で加水分解され、これらの残基がイオン対の形成に重要であれば、薬剤の放出が生じる。同様に、ライソゾームのカルボキシペプチダーゼの作用によっても、内在化後の薬剤の放出が高まる。もう一つの可能性は、ライソゾームのエラスターゼの加水分解に感受性を示すアラニン連続配列の挿入である。

上記のオリゴペプチドは、様々な既知の方法のいずれを用いても合成することができる。必要に応じて、上記のように、オリゴペプチドの合成後、

ある種のアミノ酸残基にさらに側鎖を結合させることができる。ペプチドのアミドは、4-メチルベンジルヒドリルアミンで誘導化された架橋されたポリスチレン-1%のジビニルベンゼン樹脂を用いて、そしてペプチド酸はPAM(フェニルアセタミドメチル)樹脂を用いて調製することができる(Stewartら、"Solid Phase Peptide Synthesis," Pierce Chemical Company, Rockford, , 1984)。この合成は、Applied Biosystems 430Aなどの市販の合成剤を用いて、またはMerrifieldらの方法(Biochemistry, 21:5020-31, 1982)もしくはHoughton(PNAS 82:5131-35, 1985)の方法に従って実施できる。側鎖の保護基は、Taw-MerrifieldのHF法(Tamら、J. Am. Chem. Soc. 105:6442-55, 1983)を用いて除去される。

上記ペプチドは、20%酢酸で抽出し、凍結乾燥して、Vydac C-4 分析用カラムを装着した逆相HPLCにより、50分間で100% H₂Oから100%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸の直線濃度勾配をかけて精製した。このペプチドの分析は、

PTCアミノ酸分析によって行う(Heinriksonら、Anal. Biochem. 136:65-74, 1984)。気相での加水分解(Meltzerら、Anal. Biochem. 160:356-61, 1987)後、配列決定は、エドマン分解または質量分析によって行う。

上記オリゴペプチドは、それが標的タンパク質に結合し得る、システインまたはリシンなどのアミノ酸残基(通常では、ペプチドのN末端またはC末端で)含むように設計することができる。必要に応じて、残基を直交的に保護したり、タンパク質との反応直前または反応中に脱保護することができる。一例として、(ニトロビリジেনスルフェニル)システインが挙げられる。このオリゴペプチドは、様々な既知の二機能性架橋剤のいずれを用いても、標的タンパク質に結合させることができる(薬剤の結合後が好ましい。)架橋剤は、オリゴペプチドのアミノ酸配列に応じて選択する。オリゴペプチドがリシン残基を含む場合、ビス(スルフォスクシミジル)基質などの、アミン反応性二機能性架橋剤を使用することもできる。ま

た、水溶性カルボジイミドのカップリング剤は、一方の反応体(すなわち、オリゴペプチドまたは標的タンパク質)の遊離アミノ基と他方の反応体のカルボキシル基との間で結合を形成するために用いられる。

以下の実施例によって、「アンチメリズム(antimerism)」の概念を説明する。これらの実施例では、ドキソルビシンを取り上げるが、抗新生物剤の典型としての構造式を第1図に示す。ドキソルビシンは、それが様々な腫瘍に有効な承認薬であり、広範に適用され、その化学療法剤の作用機構ならびに薬物動態が研究されているために、例示を目的として選択した。さらに、ドキソルビシンは、生体化合物と薬剤との相互作用の研究において典型的な化学療法剤としてしばしば使用される。
実施例1. ドキソルビシン用アンチマー

少なからぬ例で、天然に存在するアンチマー構造が用いられている。この構造は、薬剤のドキソルビシンに結合する。フラビンアデニンジヌクレオチド(PAD)(第1図参照)は、還元状態のとき、

アンチマー官能基を有し、この基がカルボキシル基および水酸基と水素結合し、FADの陰性リン酸基とダウノサミン糖のアミノ基との間でイオン性相互作用及び平面環同士の間で π 結合を行う。

実施例2 アンチマー-薬剤複合体の調製法

この方法では、薬剤は、初めに「活性化された」アンチマーと複合体形成し、続いて抗体に接合する。アンチマーは、まず、抗体分子の還元型スルフヒドリル基に結合し得る、マレイミドなどの求核基を用いて誘導体にする。この複合体形成は、希薄で中性pHの緩衝液（わずかに低張）中で、FADとドキシソルビシンとを混合する段階から始まる。アンチマーは、薬剤とアンチマーとの1:1複合体（等モル）の形成をまず促進する濃度で用いる。薬剤とアンチマーの最初の結合は、10%硫酸アンモニウムなどの脱水剤の添加によって促進されるであろう。この薬剤は2~4 mg/mlといった比較的高濃度で添加される。その結果、アンチマーの大部分が、薬剤と複数の非共有結合的相互作用によって複合体形成され、少しの部分が沈

澱を生じる。

複合体形成に際し、水素結合、イオン結合、および π - π 相互作用によって、複合体が安定化する。複合体形成の終了後、この複合体を、室温で1時間抗体と反応させる。そのとき、薬剤/アンチマーのモル比は、抗体のその10ないし100倍とする。モノクローナル抗体などの抗体は、ジチオスレイトール(DTT)を用いた還元によって複合体形成のために用意される。（実施例4参照）。

続いて、未結合の薬剤/アンチマーはゲル濾過によって除去する。直接の複合体形成により抗体1分子当たり6ないし10分子の薬剤/アンチマー複合体が結合し、またはアルブミンなどの担体を介して複合体15~40分子が結合するであろう。

実施例3 アンチマー/薬剤複合体の後形成法

第一例として、FADを直接抗体に結合させた。1 mgの抗体を2 mgのFAD (5 mg/ml)と混合した。この溶液を水浴中で37℃に温め、2 mgのEDCI (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド) 10 mg/mlを添加し

た。1 N HClでpHを約6.0に調整し、反応液を37℃で約20分間攪拌した。0.05 M PBS (pH 9.0) 0.7 mlを、pHが8.0~8.5になるまで反応液に加えて混合した。続いて、0.25%グルタルアルデヒド (I型-Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 100 μ lを、ゆっくりと攪拌しながら加えた。次に、この複合体を、リン酸緩衝液(PBS)を用いたゲル濾過によって反応体から精製し、限外濾過によって濃縮し、2容のPBSで少なくとも2回洗浄した。典型的には、10分子のFAD/抗体がこの方法で結合する。100 μ mol過剰のドキシソルビシンを、37℃で60分間反応させ、4℃で一晩放置した。遊離の薬剤を、ゲル濾過と限外濾過を組み合わせる抗体/アンチマー/薬剤複合体から除去した。典型的には、抗体に結合したFAD分子当たり1 molの薬剤がに取り込まれる。

アンチマー複合体を用いる二番目の例では、Reactive Blue 4(RB4)(Aldrich Chemical Co.)などの色素が用いられ、最初にヒト血清アルブミン(HSA)に結合させ、続いて抗体に接合させた。

pH 8.5の0.2 M重炭酸ナトリウム緩衝液中2 mgのヒト血清アルブミン (10 mg/ml)を、7.5 mgの活性型RB4と反応させた (RB4のクロロ基によるタンパク質のアミノ基のアルキル化)。水中20 mg/mlのRB4を、1時間室温で反応させる。pH約10の1.0 Mリジンをを用いて反応を停止した。この複合体をゲル濾過によって洗浄すると、約7 RB4分子/ヒト血清アルブミン(HSA)が得られた。このアルブミン誘導体を、pH 9.8の10% DMSO/エタノール中のSMCC 1 mgと室温で1時間反応させた。過剰の反応体をゲル濾過によって除く。抗体 (10 mg)を、室温で30分間8 mgのDTTと反応させた。過剰の反応体を脱気したPBSを用いるゲル濾過によって除去し、抗体 (SH)をSMCCにより誘導体にしたアルブミンと反応させた。この複合体は、続いて、4℃で一晩かけて100 μ molの過剰ドキシソルビシンと反応させ、次に未結合の薬剤を除去した。

実施例4 アンチマー/薬剤の親和性の評価

可溶性アンチマーへの、または抗体もしくは担

体に結合したアンチマーへの薬剤の結合親和性は、例えば、アルブミンまたはカルジオリピン含有リボソームとの競争反応によって評価し得る。カルジオリピンはドキソルビシンの強力なアクセプタである。リボソームと会合したドキソルビシンを分光光度法により測定した。アルブミンに会合したドキソルビシンも、分光光度法により測定した。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ による分別沈澱、またはCibacron Blueセファロースへの結合によって、一度アルブミンを抗体から分離した後、2種類の薬剤アクセプタを用いて抗体もしくは担体に結合した薬剤をチャレンジし、そして血清中もしくは標的膜全体での解離速度を示した。1例として、抗体または担体上の還元型フラビンアデニンジヌクレオチドに結合したドキソルビシンは、アルブミンによりチャレンジされた場合結合したドキソルビシンの低下は認められないが、カルジオリピンリボソームへのドキソルビシンの輸送が見られた。酸化型フラビンアデニンジヌクレオチドを用いて結合数を低下させると、カルジオリピン含有リボソームへの

より急速な輸送が可能となるが、アルブミンへの輸送はなお低レベルである。この系は、アルブミンと薬剤の相互作用の適当な親和性についての試験として用いられ、薬剤／アンチマー複合体中の非共有結合の数が腫瘍部位での薬剤の供給および放出のための適当な親和性をもたらすか否かを前以て知ることができた。アクセプタが未知の幾つかの場合、適切な標的細胞から調製した膜が競争物質として使用することもできよう。

二番目の方法は、アンチマーと薬剤との間の累積非共有結合エネルギーの概算を可能にする。現在用いられている多数の化学療法剤は、生理学的pHで帯電する。ドキソルビシンは、ダウノサミン糖のアミノ基により正電荷を帯びている。アガロースゲルの等電点電気泳動によって分析すると、ドキソルビシンは陽極に移動し、容易に可視化され得る。ドキソルビシンと安定に非共有結合しそしてイオン性相互作用を満たすアンチマーとの複合体形成の場合、薬剤／アンチマー複合体は、アガロースゲルの等電点電気泳動の原点に止まる。

薬剤とアンチマーの解離が生じるまで電界強度を調節することによって、アンチマーと薬剤間での結合親和性を間接的に調べる。

実施例5. 薬剤／アンチマーの免疫複合体の効力および選択性

薬剤複合体の効力および選択性は、抗原陽性細胞および抗原陰性細胞とを比較した*in vitro*の細胞障害アッセイによって測定できる。そういったアッセイの一つでは、MTT色素の取込みおよび代謝を利用して、残留生存細胞を測定する。

共有結合性および非共有結合性の抗体／アンチマー／薬剤ドキソルビシン複合体の効力および選択性を第2図に示す。2つのタイプの共有結合複合体がベンチマークとして使用された。第1は、架橋剤としてEDCIを使用するドキソルビシンの複合体である。第2の場合は、ドキソルビシンがグルタルアルデヒドを用いる架橋反応によりダウノサミン糖のアミノ基を介して抗体に結合している。EDCI結合した非代謝性複合体は、同じ細胞系に対して遊離薬剤と比較した場合、 $\mu\text{ol}/\mu\text{ol}$ で、抗体

複合体の3つのタイプ中で有効性が最も低かった。アミノ結合した複合体によって、効力のより高い値が得られるが、抗原陰性細胞系に対する選択性を示さない。アンチマー／薬剤免疫複合体は、効力が遊離薬剤より高く、共有結合複合体より優れた選択性を有する。これらの結果は、アンチマーに対する薬剤 $\text{pI} \sim \text{pI}$ イオン結合および水素結合のような非共有結合性相互作用を用いるアンチマー複合体形成によって、有効でより選択性の高い複合体が得られることを示している。

アンチマーが薬剤の官能基を占有し、抗原非特異的に細胞膜と相互作用するので、選択性が改善される。細胞表面の抗原に対する抗体の結合に際し、細胞の脂質膜と非共有結合薬剤との併置は、ドキソルビシンの脱離を引き起こし、そして、原形質膜内または上の受容体部位への薬剤の輸送するのに十分である。

実施例6 担体上における部分またはあらかじめ存在するアンチマーへの薬剤複合体形成

この実施例では、低い親和性と若干高い親和性の両方の部位を有するアルブミンを、第1表に示すように、脱水剤の存在下でタンパク質1mol 当たり薬剤100molにさらした。脱水剤が存在しないと、2mol 未満の薬剤が1mol のアルブミンに結合し、薬剤は急速に溶出(leaching)した。脱水剤の存在下では、低親和性及び高親和性をもって〔例えば、急速または緩徐な消失溶出(leaching)〕タンパク質1mol 当たり6～15mol の薬剤が結合した。複合体は、過剰な遊離薬剤の除去後、凍結乾燥され、通常の薬剤として再構成され、ドキソルビシンの徐放剤として投与される。

アルブミン上の高親和性部位の数は、アルブミンに対するA Z P上の活性型カルジオリビンの複合体形成によって増加する。これら「部分的」アンチマーの幾つかは、アンチマー構造を完成させるであろう内因性アミノ酸の官能基と併置状態を

取るであろう。薬剤の複合体形成は上記のように行われ、徐放性を備えた薬剤／担体複合体が生じる。

実施例7 可溶性薬剤／アンチマーの製剤化

アンチマー単独使用のほとんどの場合、ドキソルビシンなどの薬剤は、実施例2に示すような脱水剤の有無にかかわらず、アンチマーと複合体を形成する。脱水剤を用いた場合、エチレングリコールのような静注に適するものが好ましい。アンチマー、FADについては、タンパク質への結合を目的としなければ、追加の官能基が、薬剤とのさらなる相互作用のために用いられ、高親和性結合を生じる。カルジオリビン-リボソームによるチャレンジに際しては、遅い輸送動態のみが認められる。これらの結果は、ドキソルビシン／アンチマーのin vivo 心臓毒性の低さと相関していた。

実施例8

ドキソルビシンを、250Kd の黒色腫関連抗原に特異的なモノクローナル抗体、NR-M L-05 と共有結合により複合体形成せしめる。共有結合

性複合体の形成機構は、この分野ではよく確立されている。ドキソルビシンに対する酸化型FAD、非酸化型FAD、プロブナロール又はその他のアンチマーを添加し、そして次に透析する。非共有結合したアンチマーとの薬剤複合体を、抗原陽性(M14+)細胞系および抗原陰性(M14-)細胞系に対して評価し、遊離ドキソルビシンおよびアンチマーのないドキソルビシン/NR-M L-05 複合体に対するM14+およびM14-細胞系のID50値を比較することによって、in vitroでの選択性を比較する。アンチマーと結合しない複合体にできるだけ近い効を提供するが、in vitroアッセイで定義される最大の選択性を示すアンチマーが選択される。しかしながら、そのアンチマーは、薬剤または抗体と十分安定に結合し、ヒト血清中で複合体のままで存在しなければならない。

別の態様では、マイトマイシンCを抗体に共有結合せしめる。FAD、酸化型FAD、プロブナロール又はその他のアンチマーを添加し、そして次に未結合アンチマーを透析して除去する。

マイトマイシンCの複合体は、抗原陽性細胞および抗原陰性細胞に対して試験し、様々なアンチマーにさらされた複合体と比較する。この方法によって、最大の細胞障害活性を示す複合体の選択が可能となる。

実施例9 5-フルオロウラシル(5-FU)に対するアンチマー

5-FUに対するアンチマーは、チアミン(ビタミンB₁)の側鎖を修飾することによって調製し、それを、標的タンパク質への共有結合は容易にするが、ピリジン環上の官能基をそのまま保持する。こうして、複数相互作用を介して非共有結合せしめ、合成スキームに示すように、化合物1の4-β-(N-Y-カルボキシプロピオニル)アミノメチル-5-メチル-1-N-(R-メチル-4-アミノピリミジン-5-イル)メチルチアゾールの2, 3, 4, 6-テトラフルオロフェニルエステルを調製する。

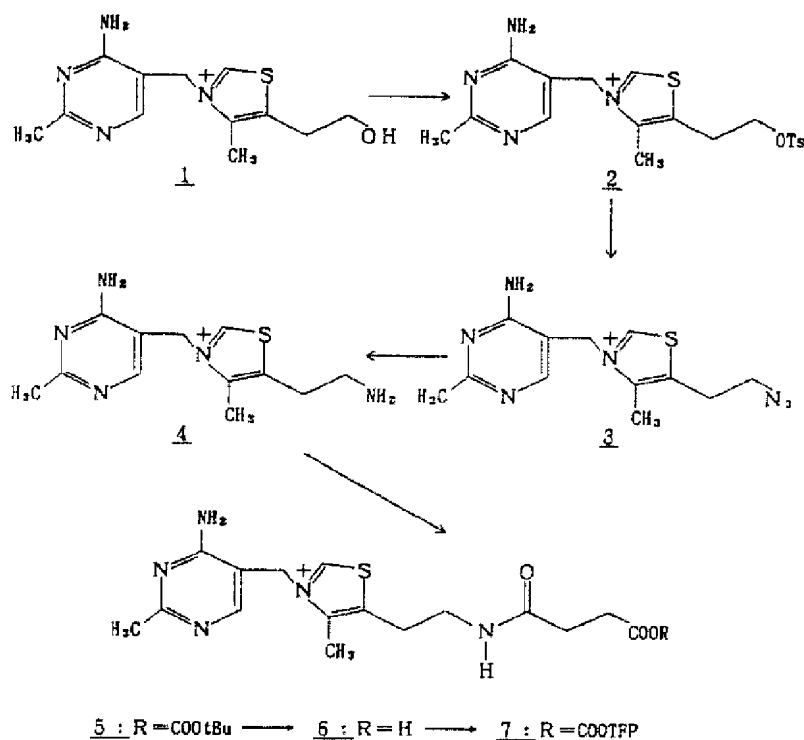
チアミン(スキーム1の化合物1)の溶液を5%の無水ピリジンに溶解し、0～5℃に冷却する。

pトルエンスルフォニルクロリド (1.1 mmol) を 5 ~ 10 分間かけて少しずつ添加する。この溶液を、2 ~ 3 時間冷却しながら攪拌し、冷却状態では一晩保存することができる。約 5 ~ 10 ml の水を添加して、溶液は必要に応じて濾過することができる。沈殿が生じなければ、溶液は真空中で蒸発乾固させる。この乾燥残渣を酢酸エチルに溶解する。この溶解した残渣を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、蒸発乾燥させると、スキーム 1 の化合物 2 で示される、O-pトルエンスルフォニルチアミン生成物が得られる。

化合物 2 を無水テトラヒドロフラン 10 ml に溶かして、1 mM の溶液とする。この溶液にトリメチルシリルアジド (1.2 mmol) を添加してから、溶液を 6 ~ 8 時間還流させる。溶液を蒸発乾燥して、残渣を酢酸エチルに溶解する。この新しい溶液を水で洗浄し、無水酢酸ナトリウム上で乾燥させてから、蒸発乾燥させると、図式 1 の化合物 3 で示される、4-β-アジドエチル-1-N-(2-メチル-4-アミノピリミジン-5-イル)メ

チルチアゾールが得られる。化合物 3 を調製用液体クロマトグラフィーによって精製する。

スキーム 1



10～15mlの無水エタノールに化合物3(1.0mmol)を溶解し、この溶液を、Paarの装置に入れた硫化Pd-C触媒上にて大気圧で水素化する。水素化の後、触媒をセライト上での濾過によって除去し、溶媒を真空中で除去すると、図式1の化合物4、すなわち4-β-アミノメチル-1-N-(2-メチル-4-アミノピリミジニル)メチル-5-メチルチアゾールが残る。

化合物4(1.0mmol)を10mlの無水テトラヒドロフランに溶解し、これにコハク酸モノ-tert-ブチルエステルモノスクシミデートエステルを添加する。この溶液を混合してから、室温で2時間攪拌する。次に溶媒を蒸発させ、残渣を塩化メチレンに溶かして、水で洗浄する。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥しそして蒸発させると、図式1の化合物5で示される化合物4の誘導体が得られる。

化合物5は、tert-ブチルエステル(1mmol)を塩化メチレン10mlおよび無水トリフルオロ酢酸2mlに添加することによって遊離酸型に転化し、こ

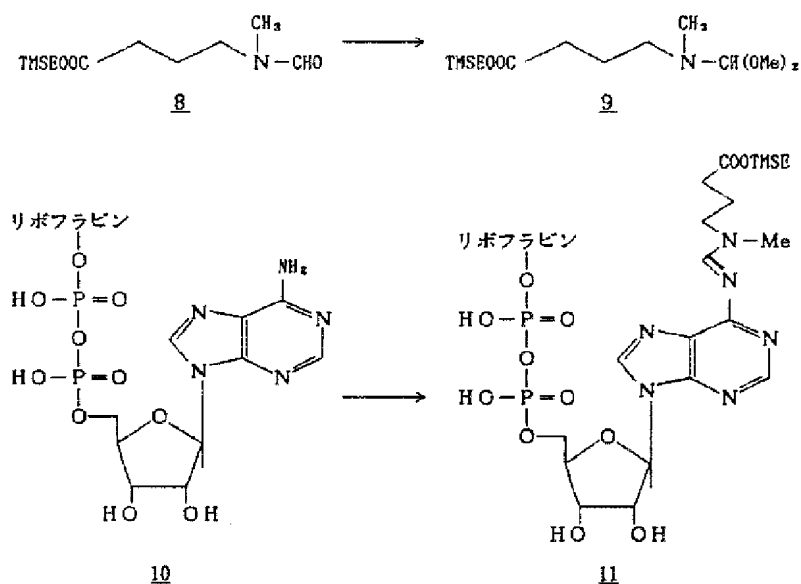
の溶液を冷却条件下で30分間攪拌する。溶液を、さらに3時間攪拌を続けながら、室温にまで戻す。溶媒を真空中で除去し、残渣を塩化メチレンとともに数回共蒸発させると、トリフルオロ酢酸が完全に除去する。エーテルを滴加することによって、遊離酸が沈殿し、これが図式1の化合物6である。化合物6を液体クロマトグラフィーによって精製する。

遊離酸の2,3,5,6-テトラフルオロフェニルエステルは、アセトニトリル：水(4：1)10ml、テトラフルオロフェニル3mlおよび1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩5mmol中に溶解した遊離酸(化合物6)1mmolの溶液から生成する。得られた溶液を室温で一晩攪拌する。沈殿した固体を濾過してから、エーテルで洗浄し、遊離のテトラフルオロフェニルを除去する。この活性エステルは、高速液体クロマトグラフィーによって精製し、図式1の化合物7が得られた。

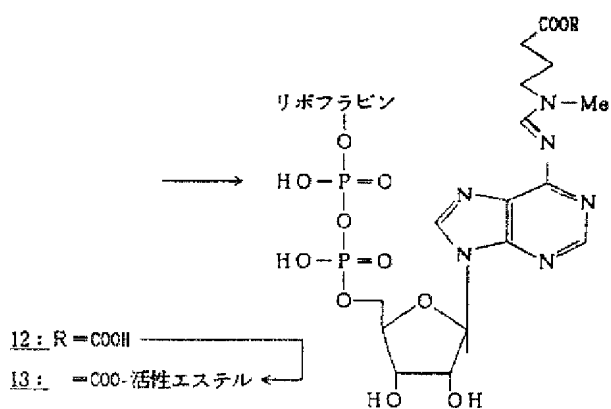
実施例10. ドキソルビシンアンチマーとしての修飾されたFDA

この実施例では、修飾されたFDAをドキソルビシンのアンチマーとするために調製した。得られたアンチマーは、リボフラビン誘導体であって、ドキソルビシンと非共有結合性相互作用をするアンチマー結合部位、および標的タンパク質に共有結合する活性エステル残基を含む。修飾型FDAアンチマーを調製する合成経路を、以下のスキーム2に示す。

スキーム 2



スキーム 2 (続き)



スキーム 2 の化合物 8 は、10-15 ml の酪酸および 2-3 滴の無水酢酸に溶解した 2 mmol の 4-(メチルアミノ)酪酸の溶液を混合することによって生成する。溶媒を蒸発乾燥させ、エーテルを添加すると、反応産物の N-ホルミル-4-(メチルアミノ)酪酸が得られ、この 1 mmol を無水テトラヒドロフランに添加し、1.1 mmol のトリメチルシリルエタノール (TMSE) (Aldrich Chemical) および 1.1 mmol の N, N'-ジシクロヒキシルカルボジイミドと共に一晩攪拌する。固体沈澱物が生成する。この固体を濾過し、濾液を蒸発乾燥する。この残渣を酢酸エチルに溶解し、水で洗浄する。有機相を蒸発乾燥すると、N-ホルミル-4-(メチルアミノ)酪酸トリメチルシリルエステルが得られ、このエステル (化合物 8) を、触媒量の p-トルエンスルホン酸を含むメタノール (20 ml / mmol 化合物) と共に 5-6 時間還流する。このメタノールを真空中で完全に除去し、スキーム 2 の化合物 9 をカラムクロマトグラフィーによって精製する。

FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド、Pierce Chemical; 化合物10) 1 mmolを20 mlのアセトニトリル：水(1：1)に溶解し、スキーム2の化合物9、N-ジメトキシメチル-N-メチル-4-(メチルアミノ)酪酸トリメチルシリルエチルエステル(2~3 mmol)を添加し、この混合物を室温で6~10時間攪拌する。溶媒を真空中で除去し、残渣を水に懸濁し、そして酢酸エチルで抽出して過剰の化合物9を除去する。この生成物は、スキーム2で示される化合物11のフラビンN⁺- (メチル、γ-カルボキシプロピル)アミノメチレンアデノシルジヌクレオチドであって、凍結乾燥に続く液体クロマトグラフィー精製によって水溶液から単離する。

化合物11の濃縮物1 mmolを、2 mlの重炭酸トリエチルアンモニウム溶液に溶解し、続いて、蒸発乾燥する。約5 mlの水をその残渣に加え、2 mmolのフッ化カリウムまたはフッ化テトラエチルアンモニウムも添加して、この混合物を約30分間攪拌する。混合物を蒸発乾燥し、アセトンを添加し

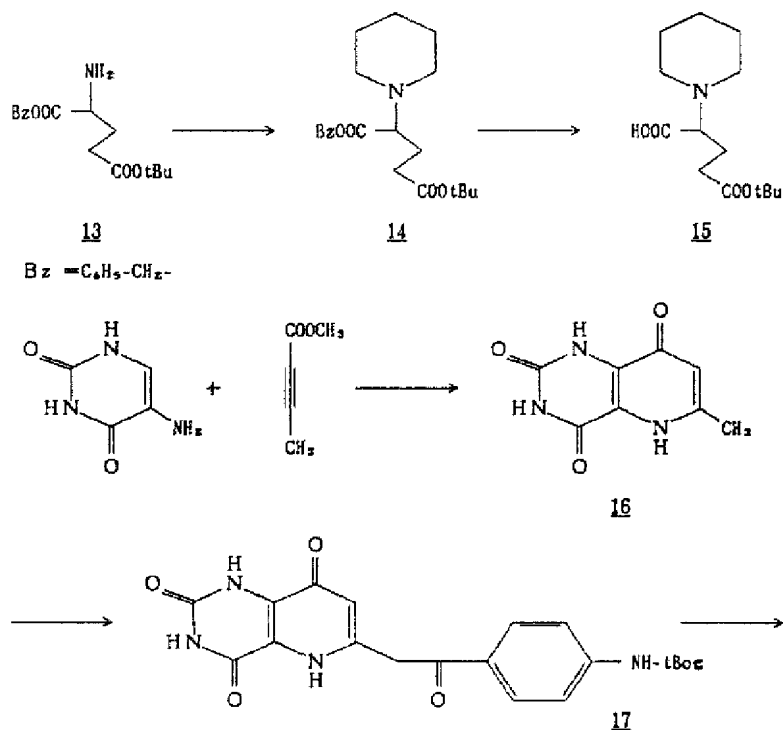
てから、溶液を共蒸発乾燥する。残渣を1：1エタノール／アセトン混合物に溶解し、それにNaClO₄の飽和溶液を添加する。固体が沈殿し、これを遠心分離によって単離し、続いて、真空デシケーター中で乾燥し、移動相としてイソプロパノール／酢酸／水を用いる液体クロマトグラフィーによって精製する。

1 mmolの遊離酸化合物12を、5 mlのアセトニトリル：水(1：1)に添加し、この溶液に3 mmolの2, 3, 5, 6-テトラフルオロデノールおよび3 mmolの1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩を添加して、溶液を室温で10~12時間攪拌する。この溶液を希釈し、エーテルで抽出して、過剰のテトラフルオロフェノールを除去すると、図式2の化合物13で示される生成物、フラビンN⁺- (メチル-2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェノキシカルボニルプロピル)アミノメチレンアデノシルジヌクレオチドが得られ、これを高速液体クロマトグラフィーによって単離する。

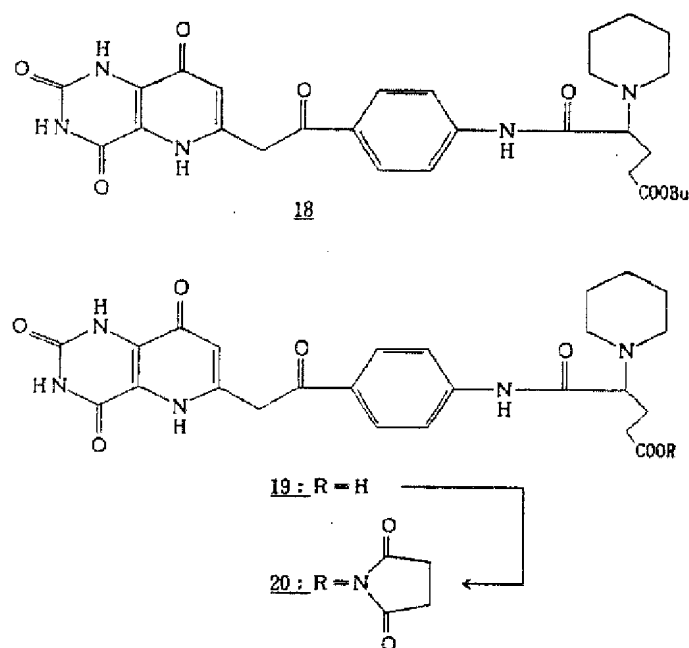
実施例11. メソトレキセートのアンチマー

メソトレキセート(MTX)に対するアンチマーは、該アンチマーをMTXに非共有結合により連結せしめるためにイオン結合相互作用および水素結合相互作用の両者を利用するものとして、生成することができた。メソトレキセートは、アンチマーのピリドピリミジン環とMTXのアデリジン環、及びMTXのグルタミン酸部分のαカルボン酸とMTXのピロリジン環により非共有結合によってアンチマーに結合する。以下のスキーム3に、アンチマーであるα-1-ピペリジニル-α-N-*p*-(2, 4, 8-トリオキソピリド[3, 2-d]ピリミジン-6-イル)アセトフェニルアミドグルタル酸-γ-スクシンイミデートエステルの生成に必要な合成法を示す。

スキーム 3



スキーム 3 (続き)



化合物 13 であるグルタミン酸- α -ベンジルエステル- γ -tert-ブチルエステルの 5 ml 溶液を、グルタルアルデヒドの 25% 溶液 5 ml に添加し、この溶液を 2~3 時間で攪拌する。この溶液にナトリウムシアノボロヒドリド 10 mmol を添加し、さらに 2 時間攪拌し続ける。溶液の水相を蒸発させ、残渣を水に懸濁して、酢酸エチルで抽出する。有機相を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させてから蒸発させると、化合物 14 が得られる。化合物 14 の 2-(ピロリジン-1-イル)-グルタル酸-1-ベンジルエステル-5-tert-ブチルエステルを、調製用液体クロマトグラフィーで精製した。

2 mmol の化合物 14 の溶液を、塩化水素 2 当量含むメタノール 20 ml 中で調製し、Paar の装置に入れた Pd-C (10%) 触媒上に 3 時間水素化する。触媒をセライト上での濾過によって除去し、濾液を蒸発させると、化合物 15 が塩酸塩として得られる。

100 ml のエタノールに溶解した 10 mmol の 5-

アミノウラシル溶液に、12.5mmolのメチル-2-ブチノエートを添加し、この懸濁液を室温で8時間攪拌する。沈殿した固体を濾過し、真空乾燥すると、4-(2', 4'-ジオキソピリミジン-5-イル)アミノクロトネートが得られる。このクロトネート懸濁液を3時間還流する。混合物を室温まで冷却し、石油エーテルを添加する。沈殿した固体を濾過し、空気乾燥すると、化合物16の2, 4, 8-トリオキソ-6-メチルピリド[3, 2-d]ピリミジンが生じる。これを結晶化によって精製する。

10mlの乾燥ジメチルホルムアミドに溶かしたp-アミノベンゾニトリルの2mmol溶液に、3mmolのジ-tert-ブチルジカルボネートを添加し、この溶液を3~5時間室温で攪拌する。溶媒を真空中で除去し、残渣を水に懸濁して、塩化メチレンで抽出する。有機相を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥すると、p-N-tert-ブトキシカルボニルアミノベンゾニトリルが得られる。これを結晶化によって精製する。化合物16の5mmol懸

濁液を5mlのヘキサメチルジシラザン、1mlのクロロトリメチルシラン、および50mlのトルエンと共に還流する。透明な溶液が得られた後に、溶媒を脱気して除くと、化合物16のトリメチルシリル誘導体が得られる。この誘導体を10mlの無水テトラヒドロフラン(THF)に溶解する。トリメチルシリル誘導体の溶液を、無水THFに溶かした1M n-ブチルリチウム6mlの冷却溶液に加える。この赤色溶液によって、化合物16の α -メチルリチウム誘導体の形成されたことが分かる。約30分間の攪拌の後、5mlの無水THFに溶解した5mmolのp-N-tert-ブトキシカルボニルアミノベンゾニトリルを5分間かけて滴加する。さらに10~15分間の攪拌を行った後、10mlの1N HClを添加して、反応で生成したアミンを加水分解する。溶媒を真空中で除去し、残渣を結晶化すると、化合物17の生成物、2, 4, 8-トリオキソピリジノ[3, 2-d]ピリミジン-6-イル)メチル-(p-tert-ブトキシカルボイル)-アミノフェニルケトンが得られる。

2mmolの化合物17を、約10mlの塩化メチレンおよび2mlのトリフルオロ酢酸に溶解し、3時間攪拌する。溶媒を除去し、残渣をエーテルで粉碎すると、アニリン中間体が得られる。2mmolのアニリン中間体溶液を、20mlのアセトニトリル：水(1:1)中2mmolの上記化合物15および5mmolの1-(ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドとともに攪拌する。反応終了後、溶媒を除去すると、化合物18で示される生成物、 α -1-ビベルジニル- α -N-p-(2, 4, 8-トリオキソピリド[3, 2-d]ピリミジン-6-イル)アセチルフェニルアミドグルタル酸-Y-tert-ブチルエステルが、シリカゲルのクロマトグラフィーによって単離される。2mmolの化合物18を、10mlの塩化メチレンおよび2mlのトリフルオロ酢酸と共に3時間攪拌する。溶媒を除去し、残渣をエーテルと共にすりつぶし、活性エステルを調製するための酸中間体を得る。この酸中間体は、スキーム3の化合物19である。化合物19(1mmol)の溶液を、1.1mmol

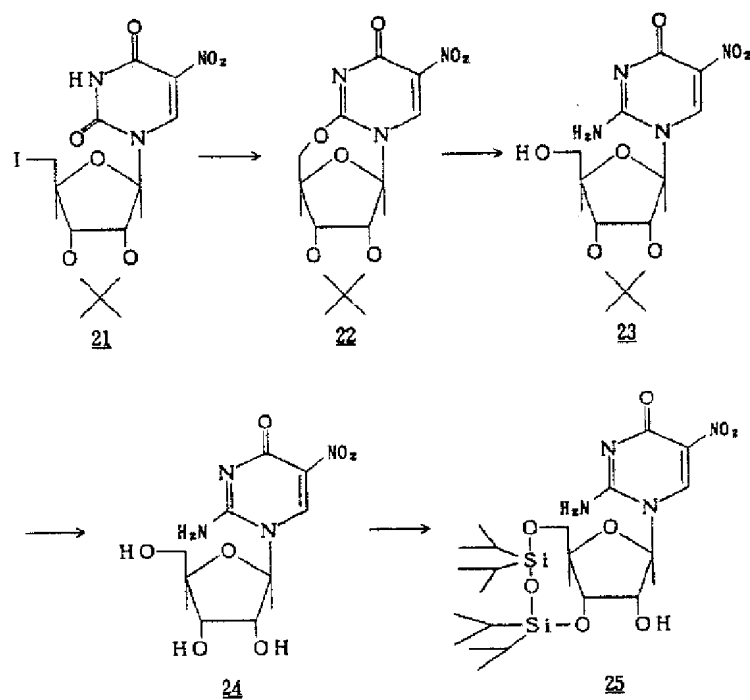
のN-ヒドロキシスクシンイミドおよび1.1mmolのN, N'-ジシクロエトキシカルボジイミドとともに、10~12時間室温で攪拌する。沈殿したジシクロヘキシル尿素を濾過し、濾液を蒸発乾燥する。残渣を酢酸エチルに溶解しそして水で洗浄する。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、真空中で蒸発乾燥すると、図式3に化合物20として示されるアンチマー生成物、 α -1-ビベルジニル- α -N-p-(2, 4, 8-トリオキソピリド[3, 2-d]ピリミジン-6-イル)アセチルフェニルアミドグルタル酸-Y-tert-ブチルエステルが生ずる。最後の精製は、高速液体クロマトグラフィーで行う。

実施例12. シトシンアラビノシド(ARA-C)のアンチマー

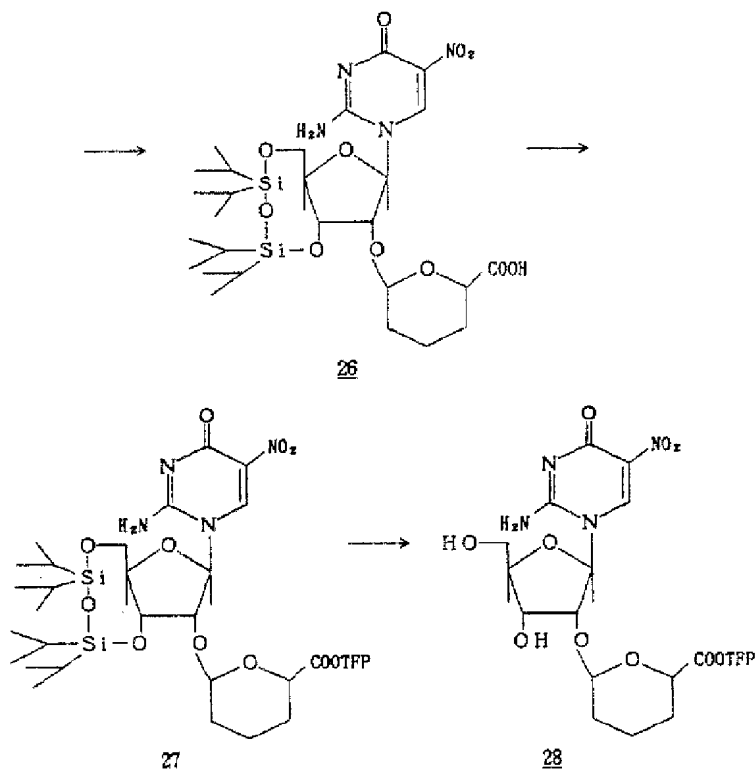
ARA-Cのアンチマーは、ARA-C分子のニトロイソシチジン基と反応する分子の設計によって調製する。その反応は、イオン相互作用および水素結合によるものである。アンチマー分子の残りの部分は、該アンチマーに水溶性を付与するために設

計された。ARA-C へのアンチマーの調製をスキーム 4 に示す。

スキーム 4



スキーム 4 (続き)



スキーム 4 で示される化合物 21 の 5'-デオキシ-5-アイオド-2', 3'-O-イソプロピリデン-5-ニトロウリジンは、出発物質をウリジンの代わりに 5-ニトロウリジンを用いる以外、Brownら、J.Chem.Soc., 868(1957)によって使用されたものと同じ方法で調製する。化合物 21 は、スキーム 4 の化合物 22 である 2, 5'-アンヒドロ-2, 3-O-イソプロピリデン-5-ニトロウリジンに転化される。化合物 22 は、飽和メタノールアンモニアと反応し、スキーム 4 の化合物 23 である 2, 3-O-イソプロピリデン-ニトロイソシチジンが生じる。化合物 23 を、98% 鱈酸を用いて脱保護し、化合物 24 の 5-ニトロイソシチジンが得られる。

2 mmol の化合物 24 の溶液を、2 ml のテトラヒドロフランに対して 2.5 mmol のトリエチルアミンおよび 1.1 mmol の 1, 3-ジクロロ-1, 1, 3, 3-テトライソプロピルジシロキサンを含む 20 ml の無水テトラヒドロフランを用いて調製する。

この溶液を 8 時間攪拌して、蒸発乾燥する。残

渣を塩化メチレンに溶解し、薄層クロマトグラフィーによってシリカゲル上で精製する。残渣は、化合物 25 の 3, 5-テトライソプロピルジシロキシ-5-ニトロイソシチジンであった。

1 mmol の化合物 25 の溶液を、触媒量の p-トルエンスルホン酸、および 1.1 mmol の 3, 4-ジヒドロ-2H-ピラン-2-カルボン酸を含む無水テトラヒドロフラン 10 ml 中に調製する。この溶液を 3~4 時間攪拌してから、真空中で蒸発乾燥すると、6"-カルボキシ-2'-テトラヒドロピラン-2"-イル-3', 5'-テトライソプロピルジシロキシ-5-ニトロイソシチジンである化合物 26 が得られた。化合物 26 をカラムクロマトグラフィーにより精製する。化合物 26 のテトラヒドロフランエステルを、化合物 27 としてスキーム 4 に示す。

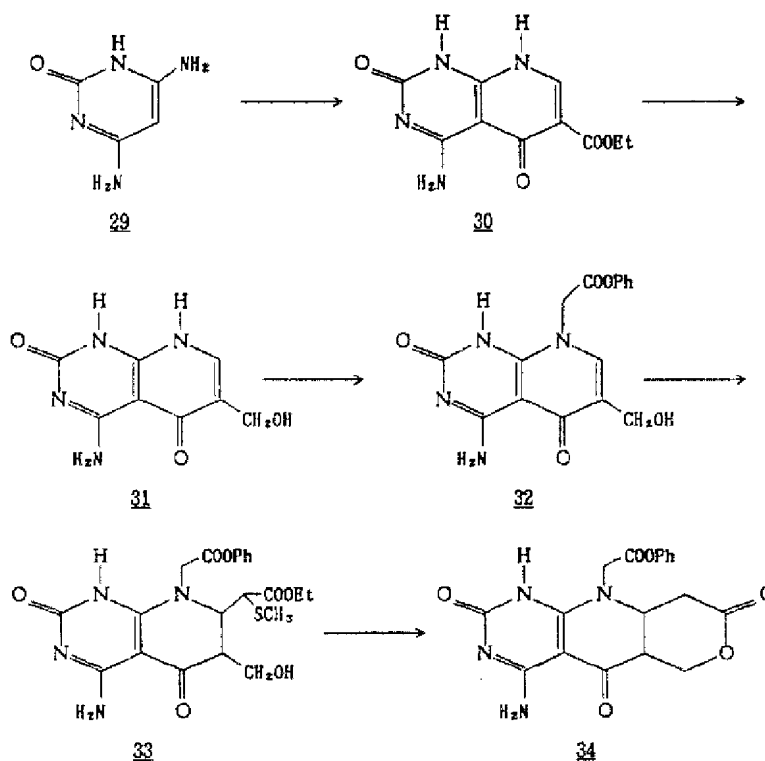
1 mmol の化合物 27 を、水分 10% の THF 中 1.1 ml のフッ化テトラ-n-ブチル-n-アンモニウムと 30 分間混合する。溶媒を真空中で除去すると、生成物である化合物 28 の 6"- (2,

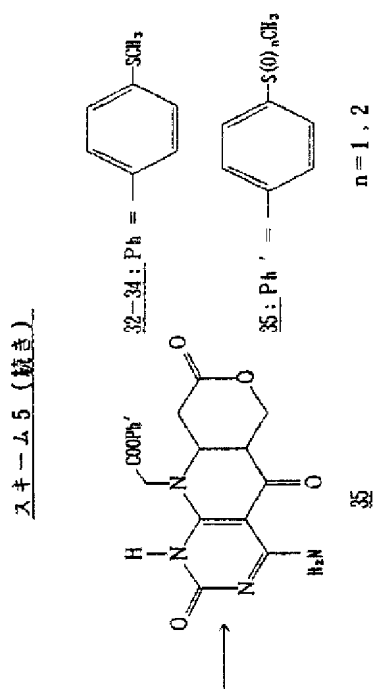
3, 5, 6-テトラフルオロフェノキシカルボニル)-2'-テトラヒドロピラン-2''-イル-5-ニトロイソシチジンを含む残渣が得られ、化合物28をシリカゲルの薄層クロマトグラフィーによって精製し、最終精製を高速液体クロマトグラフィーによって行う。

実施例13. マイトマイシンCのアンチマー

スキーム5に、活性エステルからマイトマイシンCのためのアンチマーの合成法を示す。

スキーム5





5 mmol の 4, 6-ジアミノ-2-オキソピリミジンと 10~15 mmol のジエチルエトキシメチレンマロネートの混合物を混合し、120℃~150℃で 6~8 時間加熱する。透明な溶解物が得られる。エタノールの除去を容易にするためにこの温度を維持する。エタノールの除去後、混合物を室温にまで冷却し、固体の塊をエタノールと共にすりつぶし、濾過することにより中間生成物の 2-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-6-イル)アミノメチレンマロネートが得られる。上記のマロネート誘導体を攪拌し、Dowtherm A 中で環化を完全に行うために 3~5 時間加熱する。その結果、スキーム 5 で示される生成物 30 の 4-アミノ-6-カルベトキシ-2, 5-ジオキソピリジノ [2, 3-d] ピリミジンが得られる。沈殿した固体を濾過し、石油エーテルで洗浄して、還元段階の前に再結晶化する。

20 ml の無水 THF 中の化合物 30 の懸濁液を、2 mmol の LiAlH_4 中に調製する。還元反応であれば、進行 TLC (薄層クロマトグラフィー) によって

観察される。還元が不完全であれば、 LiAlH_4 の一部を加えて完了させる。少量の冷水を滴加して過剰の試薬を分解し、そして次に濾過する。濾液を氷酢酸で酸性にし、蒸発乾燥すると、化合物 31 で示される生成物、4-アミノ-6-ヒドロキシメチル-2, 5-ジオキソピリド [2, 3-d] ピリミジンが得られる。化合物 31 を再結晶化する。

2 mmol の無水カリウムカルボネートおよびクロロ酢酸 p-(メチルチオ)フェニルエステル (1 mmol) を含有する無水ジメチルホルムアミド中 1 mmol の化合物 31 の溶液を、標準法による p-(メチルチオフェニルエステル) とクロロ酢酸の DCC 縮合によって調製し、添加し、そして混合物を一晩攪拌する。溶媒を真空中で除去し、残渣を水に懸濁し、酸性にし、濾過および結晶化を行って、化合物 32 で示される生成物の 4-アミノ-6-ヒドロキシメチル-2, 5-ジオキソピリジノ [2, 3-d] ピリミジン-N⁺-酢酸 p-(メチルチオ)フェニルエステルが得られる。

テトラヒドロフラン中メチルチオ酢酸エチルエーテルのナトリウム塩の溶液を、塩化ナトリウムをメチルチオ酢酸エチルエーテルに添加することによって調製する。この溶液を、無水ジメチルホルムアミド (DMF) 中化合物 32 の溶液に加えて、それを 50℃~60℃に加熱し、反応を終了させる。この反応過程を、試料を抜き取りながら監視する。そして、酢酸で酸性にして、反応を停止し、TLC によって反応の進行を調べる。反応の終了が判定された場合、この溶液を酢酸で酸性にし、溶媒の蒸発乾燥、その後の水溶液処理によって、化合物 33 すなわち 4-アミノ-6-ヒドロキシメチル-2, 5-ジオキソピリド [2, 3-d] ピリミジン-7-(α -メチルチオ)酢酸エチル-N⁺-酢酸 p-(メチルチオ)フェニルエステルを得る。

1 mmol の化合物 33 を、1 g のランニッケル (湿重量) と共にエタノール中で短時間加熱し、7- α -チオメチル基を脱チオ化した。反応終了後、1 ml の 1 N HCl を溶液に添加し、加熱を続け

て、ラクトン形成を完了させる。溶媒を真空中で蒸発乾燥させることにより生成物を得、続く再結晶化によって、化合物34のラクトン誘導体を得る。10 mlの無水テトラヒドロフラン中1 mmolのラクトン誘導体で懸濁液を調製し、2当量のm-クロロパーオキシ安息香酸とともに3~5時間攪拌する。この反応によって、スルホンとスルホキシド誘導体が生じる。これら産物を濾過によって得る。

実施例14. ドキソルビシン挿入のための側鎖を含むオリゴペプチド

ドキソルビシンに結合する合成オリゴペプチドの使用を評価する実験を行った。結合を、ドキソルビシンの可視スペクトルの変化により追跡し、475nm または565nm における薬剤の吸収スペクトルを、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で様々な濃度のペプチドを用いる検定によって解析した。結合曲線は、Enzfitter プログラム (Elsevier-Biosoft) での単純な双曲線に当てはまった。結合のスクリーニング用に使用したオリゴペプチドに

関する結果を第2表に示す。これらのペプチドは、側鎖に芳香族を含むアミノ酸間で1, 3-スベリング (すなわち、芳香族側鎖を有する2つの残基間で単一の非芳香族アミノ酸が介在する) にドキソルビシンを挿入するときの有効性を調べられるように設計した。これらのアミノ酸は、C=Cys, K=Lys, W=Trp, G=Gly, E=Glu, D=Asp, Fmoc=リジンのεアミノ基に結合した9-フルオレニルメトキシカルボニル、および MIANS=システインに結合した2-(4'-マレイミジルアニリノ)ナフタレン-6-スルホン酸であった。

これらのオリゴペプチドは、BaranyおよびMerrifield著、「The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology」, E. Gross および J. Meienhofer 編、New York: Academic Press (1980) に記載された、*boc*-ベンジル固相ペプチド合成法を用いて合成した。

第 2 表

合成オリゴペプチドによるドキソルビシンの結合

ペプチド配列	Kd, μ M
CKWGK-アミド	結合は未検出
CKWGWGK-アミド	結合は未検出
CKWGXGK-アミド	結合は未検出
KK(Fmoc)GK(Fmoc)KGCC	結合は未検出
BK(Fmoc)GGK(Fmoc)EGGC	結合は未検出
BK(Fmoc)K(Fmoc)EGGC	結合は未検出
BK(Fmoc)GK(Fmoc)EGGC	280
DK(Fmoc)GK(Fmoc)DGGC	22
BK(Fmoc)BK(Fmoc)EGGC	結合は未検出
EEK(Fmoc)GK(Fmoc)EGGC	33
EC(MIANS)GC(MIANS)EGGC(Acm)	48

第3a図は、これらの実験から得られた検定曲線の一例であり、オリゴペプチド、DK(Fmoc)GK(Fmoc)DGGC-アミドの様々な濃度に関して50 μ M ドキソルビシンの至適な検定曲線を示す。オリゴペプチドをドキソルビシン非存在下で添加したときは、

吸光度の変化は認められなかった。吸光度の濃度依存的飽和性の増大は、オリゴペプチドを薬剤に添加した場合に認められ、これによって、2つの成分間で複合体の形成したことが示唆された。このオリゴペプチド担体、DK(Fmoc)GK(Fmoc)DGGC-アミドは、ドキソルビシン (0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.0 中で50 μ M) に対して様々な濃度で添加したところ、475nm においてドキソルビシンの吸光スペクトルの変化が認められた。結合定数は、非線形の最小二乗法から得られ、Enzfitter (Elsevier-Biosoft) プログラムでの単双曲線によく一致しており、22 μ M の明らかな解離定数が得られた。

第3図に、オリゴペプチドのEC(MIANS)GC(MIANS)EGGC(Acm)を用いてドキソルビシンの検定結果を示す。このオリゴペプチドは、最初、ECGCEGGC(Acm) (ここで、Acm は、アセトアミドメチルの保護基を示す) のオリゴペプチドを合成することによって調製した。この合成は、BaranyおよびMerrifield、前記文献、およびHoughten, R.A. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5131 に示された固相法

を用いて行った。ペプチド当たりシステインのチオール基の数は、エルマン試薬での滴定によって1.8と測定された (Means, G.E.; Feeny, R.E. (1971), Chemical Modification of Proteins, San Francisco: Holden-Day, 220頁参照)。

ペプチド濃度は、ニンヒドリンを用いて測定した (Scheraga, H. (1987) Pure Appl. Chem. 50, 315 参照)。続いて、オリゴペプチドは、オリゴペプチド1 mol 当たりMIANS 2 mol でアルキル化した。MIANS (Molecular Probes, Eugene, Ore) を、このペプチドの2つのシステイン残基のチオール基に誘導体化し、565 または580nm にてpH 7.0 の0.1 M リン酸緩衝液中で、第1 a 図に示すように結合させた。見かけの至適の解離定数は、 $4.8 \mu\text{M}$ であった。

このデータによれば、1, 3 スペースング (1, 2 または 1, 4 スペースングに対立) 中の芳香族側鎖は、ドキシソルビシンの結合を助けることが示唆された。このオリゴペプチドにおいて負電荷側鎖を有する内部アミノ酸 (例えば、アスパルター

トまたはグルタメート) は、薬剤の結合に重要なようであり、その位置も同様と考えられる。このことは、ドキシソルビシンのダウノサミン成分の正電荷アミノ基と、グルタメートまたはアスパルテートとの間におけるイオン対形成に起因するようである。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、天然に存在するアンチマー、フラビンアデニンジヌクレオチドに結合するドキシソルビシン分子を示す。これら分子の配置から、2分子間で起こり得る $\pi-\pi$ 結合またはスタッキングが分かる。この薬剤/アンチマー複合体の潜在的水素結合も表される。さらに、薬剤のアミノ基とアンチマーのリン酸基との間でのイオン結合も起こり得る。複数の非共有結合性相互作用によって、高親和性の複合体が生じる。アンチマーは、抗体または担体への結合に関して活性エステルまたはマレイミドなどの典型的な求核基でそのR基を修飾できる。

第2図では、共有結合および非共有結合の抗体

(NrML-5) / アンチマー (PAD) / 薬剤 (ドキシソルビシン: Dox またはアドリアマイシンの効力および選択性を比較する。第2図でのアッセイは、抗原陽性の黒色腫細胞 (上) および抗原陰性の黒色腫細胞 (下) の両者に対する *in vitro* の細胞障害測定法である。モノクローナル抗体NrML-5は、黒色腫抗原に特異的である。棒グラフは、MTT 色素の取込みおよび代謝による測定 (実施例5) などでの生存率を示す。

第3 A 図は、ドキシソルビシン $50 \mu\text{M}$ およびペプチド RC (MIANS) GC (MIANS) BG GC (Ac) の様々な濃度 (μM) での至適検定曲線を示す。

第3 B 図は、ペプチド濃度 $4.8 \mu\text{M}$ での至適解離定数に関して、吸光波長565nm および580nm での結合を示す。

図面の浄書(内容に変更なし)

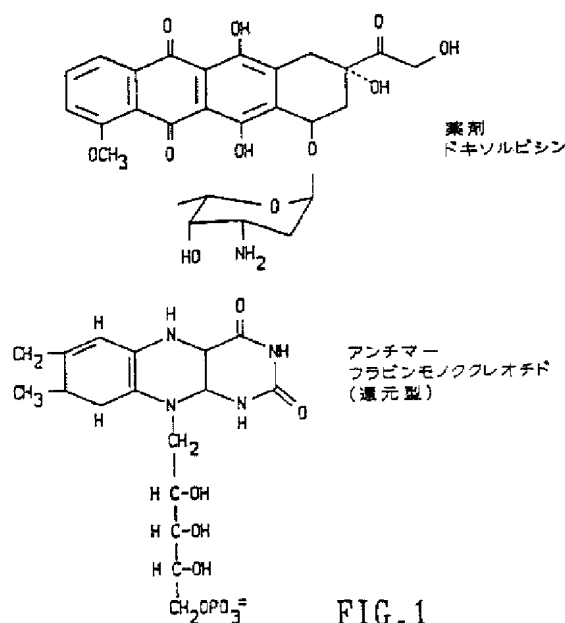


FIG.1

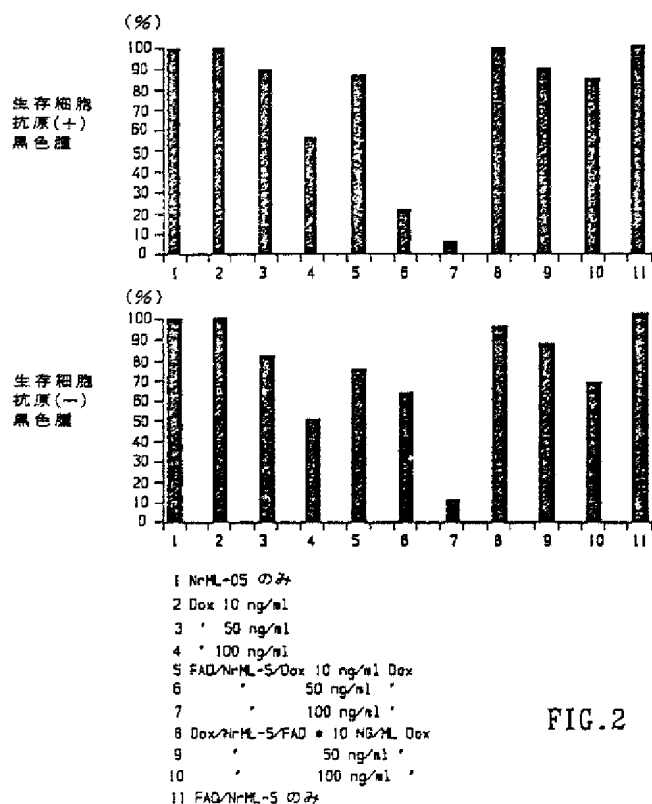


FIG.2

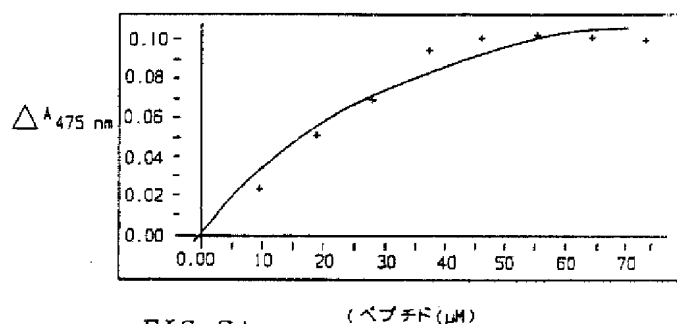


FIG.3A

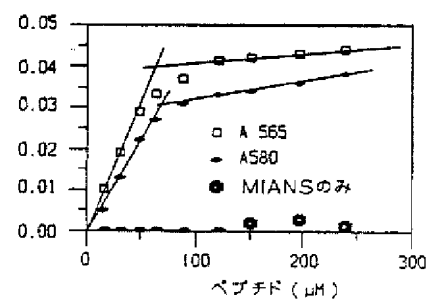
吸光度
Δ

FIG.3B

第1頁の続き

	識別記号	序内整理番号
⑤Int. Cl. ⁵		
// A 61 K	31/495	7375-4C
	31/505	7375-4C
	31/675	7431-4C
	31/71	7431-4C
	39/395	8829-4C
	ADU L	

⑬発明者 アナンサチヤリ スリ
ニバサン

アメリカ合衆国, ワシントン 98033, カークランド, ワ
ンハンドレッドナインス アベニュー ノースイースト,
11420

⑭発明者 ジョン エム. レノ

アメリカ合衆国, ワシントン 98036, プライアー, エル
ム ドライブ 2452

⑮発明者 アラン アール. フリ
ツツベルク

アメリカ合衆国, ワシントン 98020, エドモンズ, セブ
ンティフォース プレイス ウェスト, 16703

⑯発明者 ジョン エイチ. ブリ
ースト

アメリカ合衆国, ワシントン 98203, エバレット, ヒザ
ー ウェイ 7307

⑰発明者 デビッド シー. アン
ダーソン

アメリカ合衆国, ワシントン 98199, シアトル, 301, ソ
ーングイク 2415

手 続 補 正 書 (方式)

平成1年6月/6日

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1. 事件の表示

平成1年特許願第40128号

2. 発明の名称

アンチマーおよびアンチマー複合体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ネオルックス コーポレーション

4. 代 理 人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (6579) 青 木 朗

(外4名)

5. 補正命令の日付

平成1年5月30日 (発送日)

6. 補正の対象

- (1) 願書の「出願人の代表者」の欄
- (2) 委任状
- (3) 明細書
- (4) 図面

7. 補正の内容

- (1)(2) 別紙の通り
- (3) 明細書の浄書 (内容に変更なし)
- (4) 図面の浄書 (内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

- (1) 訂正願書 1通
- (2) 委任状及び訳文 各1通
- (3) 浄書明細書 1通
- (4) 浄書図面 1通

特許庁